

Die Bedeutung des Hypoxie-induzierbaren Faktor-1 in dendritischen Zellen für den Verlauf von akuten und chronischen Virusinfektionen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Yvonne Petra Hüsecken

aus Hagen

Dezember 2013

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Physiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Fandrey

2. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Gunzer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Ralf Küppers

Tag der mündlichen Prüfung: 02.04.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Das Immunsystem	7
1.1.1	Das angeborene Immunsystem.....	7
1.1.2	Das adaptive Immunsystem	13
1.2	Der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF).....	17
1.2.1	Aufbau und Funktion von HIF	17
1.2.2	Regulation und Aktivierung von HIF-1	19
1.2.3	HIF-Zielgene	22
1.3	Das Friend Retrovirus.....	23
1.3.1	Entdeckung und Tiermodelle für Retroviren	23
1.3.2	Virologische Grundlagen	24
1.3.3	Das murine Friend Leukämie Virus	26
1.4	Zielsetzung.....	30
2	Material.....	31
2.1	Versuchstiere	31
2.2	Verwendete Geräte	32
2.3	Verwendete Materialien	33
2.4	Chemikalien und Zellkulturmedien	34
2.5	Häufig verwendete Puffer und Medien	35
2.6	Antikörper.....	36
2.7	Zytokine, Zelllinien und Viren	38
2.7.1	Zytokine	38
2.7.2	Zelllinien	38
2.7.3	Viren.....	38
2.8	cDNA-Synthese, PCR und Echtzeit-PCR	39
2.9	Oligonukleotid-Primer.....	39
2.10	Genotypisierungsprimer	40

3	Methoden	41
3.1	Tierversuche	41
3.1.1	Genotypisierung	41
3.1.2	Infektion	42
3.1.3	Organentnahme	42
3.2	Herstellung von Milz- und Knochenmarksuspensionen.....	43
3.3	Zellzahlbestimmung	43
3.4	Zellkultur	43
3.4.1	Dendritische Zellen aus dem Knochenmark	43
3.5	Magnetische Zellsortierung	44
3.5.1	Isolation von CD8 ⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten.....	45
3.6	T-Zellproliferations- und Aktivierungsassay.....	45
3.7	Nachweis von infektiösen Zellen in der Milz ("Infectious Center Assay")	47
3.8	Durchflusszytometrie.....	48
3.8.1	Färbung von Oberflächenproteinen.....	50
3.8.2	Intrazelluläre Färbungen	51
3.8.3	Apoptosemessung.....	52
3.8.4	Ausschluss toter Zellen in der Durchflusszytometrie	52
3.9	Proteinisolierung.....	54
3.9.1	Gesamtzelllysate.....	54
3.9.2	Proteinbestimmung nach Lowry	54
3.10	Western Blot	54
3.11	RNA Isolierung und cDNA Synthese.....	56
3.12	PCR und Echtzeit-PCR.....	57
3.13	Histologische Methoden	60
3.13.1	Fixierung und Paraffineinbettung von Organen.....	60
3.13.2	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	60
4	Ergebnisse	61
4.1	Knock-out-Effizienz in BmDCs aus CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen	62

4.2	Einfluss akuter und chronischer FV Infektion auf Viruslast und Milzstruktur in HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ und CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen	63
4.2.1	Chronische FV Infektion resultiert in einigen HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen in massiver Splenomegalie und erhöhter Anzahl von Erythrozyten	63
4.2.2	Chronische FV Infektion kann zu einer rezidivierenden Viruslast in der Milz und zu erhöhter FV mRNA in BmDCs von HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen führen.....	65
4.2.3	Akute und chronische FV Infektion führen zu strukturellen Veränderungen der Milzhistologie in HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen	68
4.3	Verteilung der Immunzellpopulationen in der Milz nach FV Infektion.....	71
4.3.1	Erhöhte Anzahl antigenpräsentierender Zellen und Granulozyten in der Milz von HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen nach chronischer FV Infektion.....	71
4.3.2	Chronische FV Infektion resultiert in verringerter adaptiver Immunantwort in HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen mit hoher Viruslast.....	76
4.3.3	Erhöhte Anzahl an myeloischen Suppressorzellen in der Milz nach chronischer Virusinfektion.....	78
4.3.4	Zunehmende Aktivierung von CD8a ⁺ zytotoxischen T-Zellen bei akuter FV Infektion	79
4.4	Unterschiede in der Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen aus dem Knochenmark FV-infizierter Mäusen.....	82
4.4.1	Keine Einschränkung der Vitalität von T-Zellen nach Kokultur mit dendritischen Zellen	82
4.4.2	Kokultur mit BmDCs aus FV-infizierten Mäusen resultiert in erhöhter Anzahl an aktivierten, degranulierenden und Granzym B positiven zytotoxischen T-Zellen.....	83
4.5	Akkumulation des HIF-1 α Proteins und Genexpression in den dendritischen Zellen aus dem Knochenmark FV-infizierter Mäuse.....	86
4.5.1	Erhöhte mRNA-Expression und Proteinakkumulation von HIF-1 α unter Hypoxie in den dendritischen Zellen akut infizierter Mäuse	86
4.5.2	Induktion der HIF-1 Zielgenexpression in dendritischen Zellen während der frühen Phase der akuten Infektion.....	89

4.5.3	Reduzierte MHC I und MHC II mRNA Expression nach Maximum in früher akuter Phase der Infektion.....	91
4.5.4	Hypoxie in dendritischen Zellen führt zu einer ausgeprägten Induktion der TLR7 mRNA-Expression nach akuter FV Infektion	93
4.6	Chronische FV Infektion in CD4Cre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen.....	94
4.6.1	Ähnliche Entwicklung in Milzgewicht und Viruslast bei HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ und CD4Cre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen nach chronischer FV Infektion	94
4.6.2	Hohe Viruslast führt zu einer Verdopplung der myeloischen Suppressorzellen in chronisch infizierten Mäusen	96
5	Diskussion.....	97
5.1	Einfluss akuter und chronischer FV Infektion auf das Immunsystem von HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ und CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäuse.....	97
5.2	<i>In vitro</i> Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen aus FV-infizierten Mäusen	106
5.3	Auswirkung der FV Infektion auf die HIF-1 α Proteinakkumulation und die Genexpression in den dendritischen Zellen.....	108
6	Zusammenfassung.....	114
7	Literaturverzeichnis	116
8	Anhang.....	134
8.1	Abkürzungsverzeichnis	134
8.2	Abbildungsverzeichnis	141
8.3	Tabellenverzeichnis	144
8.4	Publikationsliste.....	145
8.5	Lebenslauf	146
8.6	Danksagung	147
9	Erklärungen.....	148

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes und zugleich höchst anpassungsfähiges Netzwerk des Körpers und besteht aus zellulären und humoralen Bestandteilen. Diese können im Zusammenspiel auf die Vielzahl von körperfremden Stoffen, Krankheitserregern oder entarteten körpereigenen Zellen, wie Tumorzellen, reagieren und diese unschädlich machen. Das Abwehrsystem des Körpers wird dabei in die angeborene (unspezifische) und in die adaptive (spezifische) Immunantwort unterteilt. Eine genau definierte Abgrenzung beider Systeme voneinander ist aufgrund des engen Zusammenspiels nicht möglich.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Die angeborene Immunantwort führt unabhängig von vorheriger Pathogenexposition bei Kontakt mit Pathogenen oder deren Produkten zu einer unspezifischen Abwehr. Dies führt zu der Vermittlung eines allgemeinen Schutzes gegen Infektionen. Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems zählen Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (engl. *dendritic cell*, DC), natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Mastzellen, sowie neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten (Medzhitov 2007).

Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen erkennen Pathogenpartikel, körperfremde Mikroorganismen und entartete Körperzellen anhand ihrer Oberflächenproteine und phagozytieren diese. Lösliche Proteinantigene können zudem über Pinozytose aufgenommen werden. Die aufgenommenen Zellen und Partikel werden intrazellulär abgebaut und in Peptidfragmente zerlegt, welche anschließend durch den Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC)-II an der Oberfläche der Phagozyten präsentiert werden. Durch die Präsentation der Fremdpeptide und die gleichzeitige Expression kostimulatorischer Moleküle an der Zelloberfläche sowie der Sekretion von Zytokinen erfolgt die Aktivierung und Stimulation der T-Helferzellen. Diese sind dann in der Lage eine gezielte Immunantwort hervorzurufen. Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen vermitteln somit den fließenden Übergang zwischen angeborener und erworbener Immunantwort und werden als antigenpräsentierende Zellen (engl. *antigen presenting cell*, APC) bezeichnet (Aderem & Underhill 1999; Steinman & Hemmi 2006; Kaufmann 2009). Bei der Identifizierung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (engl. *pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) spielen vor allem die Toll-like Rezeptoren (TLR) eine wichtige Rolle. Als Homo- oder Heterodimere werden sie auf der Zellmembran wie auch in der endosomalen Membran exprimiert und können spezifisch bakterielle Partikel oder virale Nukleinsäuren binden (Borden et al. 2007).

Ebenso wie die mononukleären Phagozyten sind auch neutrophile Granulozyten professionelle Phagozyten, gehören jedoch nicht zu den antigenpräsentierenden Zellen (Kaufmann 2009). Eosinophile und basophile Granulozyten hingegen sind, ebenso wie Mastzellen, vor allem an der Immunabwehr gegen multizelluläre Parasiten wie Würmer beteiligt. Die Funktion der Mastzellen ist nicht auf die Abwehr von Parasiten beschränkt. Im Verlauf bakterieller Infektionen können sie direkt über TLRs aktiviert werden. Ebenso wie Basophile sezernieren und speichern sie unter anderem Heparin und Histamin, welches z.B. bei allergischen Reaktionen von Bedeutung ist. Während Eosinophile und Basophile zum Infektionsort rekrutiert werden, sind Mastzellen ortsständig und kommen in der Submukosa vom Darm und im Bindegewebe vor. Die Aktivierungsmechanismen von Mastzellen, Eosinophilen und Basophilen durch Parasiten sind weitgehend unbekannt (Prussin & Metcalfe 2003; Medzhitov 2007).

NK-Zellen wurden ursprünglich als Zellen des angeborenen Immunsystems definiert. Ihre Zugehörigkeit ist allerdings aufgrund einiger B- und T-Zell-ähnlicher Merkmale nicht mehr eindeutig. NK-Zellen entwickeln sich, ebenso wie T-Zellen, aus gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzellen (engl. *common lymphoid progenitor*, CLP), müssen aber nicht im Thymus reifen (Sun & Lanier 2011). Sie besitzen die Fähigkeit ohne vorherige Aktivierung körperfremde Peptidantigene zu erkennen und bilden eine rasche, unspezifische Abwehr gegen extra- und intrazellulär lokalisierte Infektionserreger (Scott & Trinchieri 1995; Timonen et al. 1981). Körpereigene, gesunde Zellen werden an den exprimierten MHC I-Proteinen erkannt, während Tumor- und virusinfizierte Zellen häufig eine veränderte oder reduzierte MHC I-Expression zeigen (Bukowski & Welsh 1985). Durch Aktivierung kann die Anzahl von NK-Zellen rasch zunehmen. Dabei sind sie in der Lage sich zu langlebigen Gedächtnis-NK-Zellen zu entwickeln. Dieser Mechanismus wird ansonsten nur bei Zellen des adaptiven Immunsystems beobachtet (Sun et al. 2009; Sun et al. 2011).

Neben den adaptiven Immunzellen bieten auch die Haut und Schleimhäute eine wirksame Barriere und Schutz gegen Pathogene und symbiotische Mikroorganismen. Sowohl die Keratinozyten der Haut als auch die Epithelzellen der Mukosa können nach Kontakt mit PAMP an den Mustererkennungs-Rezeptoren (engl. *pattern-recognition receptor*, PRR) antimikrobielle Peptide ausschütten. Zusätzlich können die Epithelzellen der Mukosa Muzine sezernieren, welche die Anheftung und das Eindringen von Pathogenen verhindern (Medzhitov 2007).

Neben den zellulären Bestandteilen gehören auch humorale Komponenten zum angeborenen Immunsystem. Das Komplementsystem spielt dabei sowohl bei der spezifischen als auch der unspezifischen Immunantwort eine wichtige Rolle (Carroll 2004). Eine Aktivierung des Komplementsystems erfolgt über Antigen-Antikörper-Komplexe oder durch Kollektine, Fikoline oder Pentraxine. Zudem führt es zur Inaktivierung gramnegativer Bakterien und Viren durch Lyse und zur Rekrutierung von Phagozyten zum Entzündungsort (Holmskov et al. 2003; Bottazzi et al. 2006; Frank & Fries 1991).

1.1.1.1 Makrophagen

Makrophagen wurden erstmals 1905 von Elie Metchnikoff beschrieben (Metchnikoff 1905) und entwickeln sich, ebenso wie inflammatorische dendritische Zellen, aus im Blut zirkulierenden Monozyten. Monozyten entstammen myeloischen Vorläuferzellen des Knochenmarks und wandern nach kurzem Verbleib im Blut in die Gewebe ein, dort können sie zu phagozytierenden Makrophagen differenzieren (Randolph et al. 2008). Die klassische Aktivierung von Makrophagen erfolgt durch das von T-Zellen und NK-Zellen ausgeschüttete Typ II Interferon (IFN)- γ , welches immunregulatorisch wirkt. Es führt zu einer erhöhten Antigenpräsentation, gesteigerter Synthese proinflammatorischer Zytokine, sowie toxischer Mediatoren und vermehrter Komplementsystem-vermittelter Phagozytose (Dunn et al. 2006; Nathan et al. 1983; Martinez et al. 2009). Im Gegensatz zur Aktivierung durch IFN- γ , vermitteln Interleukin (IL)-4 und IL-13 eine alternative Aktivierung von Makrophagen, welche wichtig für die Immunantwort gegen Parasiten ist. Zudem haben diese Zytokine eine vielfältige Wirkung auf die Aktivität der Makrophagen (Wirth et al. 1989). So inhibieren IL-4 und IL-13 unter anderem die Autophagozytose und die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO[•]). Gleichzeitig führen sie zu einer erhöhten Arginase-Aktivität, zur Fusion von Makrophagen zu Langerhans-Riesenzellen und zu einer vermehrten Expression von MHC Klasse II auf der Zelloberfläche (Martinez et al. 2009; Cao et al. 1989; Abramson & Gallin 1990). Zudem kann IL-4 die Bildung von IL-1 β und IL-8 inhibieren (Standiford et al. 1990).

Das murine F4/80 ist ein spezifischer Oberflächenmarker zur Identifikation von Makrophagen (Austyn & Gordon 1981), welcher auch an nicht-phagozytierende dendritische Zellen binden kann (Kurimoto et al. 1995). Das humane Homolog zum murinen F4/80 ist EMR1 (engl. *EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*) (McKnight & Gordon 1998).

Zelluläre Oberflächenproteine werden häufig mit der Abkürzung CD (engl. *clusters of differentiation*) und einer entsprechenden Zahl bezeichnet. Dieses System wurde 1982 während des ersten *Human Leucocyte Differentiation Antigens* (HLDA) Workshops eingeführt, um die Nomenklatur zu vereinheitlichen. Weniger spezifische Marker für Makrophagen sind das

Heterodimer CD11b/CD18 (auch engl. *macrophage antigen 1* oder Mac-1), CD14 sowie CD11b und CD68, welche auch auf vielen anderen Zellen der myeloischen Reihe, wie Monozyten und dendritischen Zellen, exprimiert werden (Khazen et al. 2005; Travaglion et al. 2002).

1.1.1.2 Dendritische Zellen

Die von Ralph Steinmann beschriebenen dendritischen Zellen (engl. *dendritic cell*, DC) sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems (Steinman & Cohn 1973). Sie sind aufgrund der Vielzahl ihrer Oberflächenmarker und Immunfunktionen schwierig zu charakterisieren. Ihre Funktionen können mit anderen myeloischen Zellen überlappen und sich abhängig von ihrem Aktivierungsstatus und ihrer Lokalisation verändern (Geissmann et al. 2010). So galt CD11c einige Zeit als zentraler Marker für die Identifikation dendritischer Zellen. Jedoch wird CD11c auch auf der Oberfläche einiger anderer Zellen wie Makrophagen und NK-Zellen exprimiert, während auch CD11c⁻ DCs bekannt sind. Bislang ist kein einzelner Oberflächenmarker für die Identifikation von DCs entdeckt worden, so dass eine Charakterisierung der einzelnen Zelltypen nur durch die Kombination mehrerer Oberflächenmarker möglich ist (Shortman & Liu 2002; Hume 2008).

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt werden vier übergeordnete Zelltypen als DCs charakterisiert, zu diesen zählen die klassischen DCs (cDC), die plasmazytoiden DCs (pDC), die Langerhans-Zellen und die aus Monozyten hervorgegangenen DCs (Satpathy et al. 2012). Alle DCs haben ihren Ursprung in den Makrophagen-Dendritischen Vorläuferzellen (engl. *macrophage-dendritic progenitor*, MDP) des Knochenmarks, die sich zu Monozyten oder gemeinsamen dendritischen Vorläuferzellen (engl. *common dendritic progenitor*, CDP) entwickeln können (Schmid et al. 2010). Aus der CDP-Linie stammen sowohl die klassischen als auch die plasmazytoiden dendritischen Zellen, während inflammatorische dendritische Zellen und *Tip*-DCs (TNF/iNOS produzierende dendritische Zellen) sich aus Monozyten differenzieren (Serbina et al. 2003; Geissmann et al. 2010).

Unreife cDCs sind spezialisierte, Antigen-prozessierende und -präsentierende Zellen mit hoher Phagozytoseaktivität. Sie gelangen über das Blut in verschiedene Gewebe und exprimieren nur geringe Mengen an MHC I und MHC II auf ihrer Oberfläche (Pierre et al. 1997). DCs reifen über den Kontakt mit einem Antigen oder Zytokin und wandern anschließend über die Lymphgefäße in die T-Zellregionen von Lymphknoten oder Milz. Dort verbleiben sie und präsentieren ihren Peptid-MHC Komplex zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen (Cravens & Lipsky 2002; Schmid et al. 2010). Erst nach der Reifung der cDCs wird die Expression der MHC Moleküle induziert und sie werden darüber hinaus befähigt große Mengen an Zytokinen zu sezernieren. cDCs können für den T-Zellmarker CD8a sowohl

positiv als auch negativ sein und kommen im Gegensatz zum humanen Blut im murinen Blut nur in geringer Anzahl vor (Satpathy et al. 2012; Geissmann et al. 2010). Die seltenen pDCs verfügen über die Fähigkeit nach viralem Kontakt große Mengen an Typ I Interferonen zu sezernieren. Die verminderte Expression von MHC I und MHC II auf ihrer Oberfläche führt jedoch zu einer, im Vergleich zu cDCs, weniger effizienten Induktion der Proliferation und Aktivierung von T-Zellen (Asselin-Paturel et al. 2001; Satpathy et al. 2012).

Im Gegensatz dazu können reife inflammatorische DCs, ebenso wie cDCs, durch die gesteigerte Expression von CD11c, MHC I und MHC II naive T-Zellen effektiv stimulieren (Kamphorst et al. 2010). DCs stehen im direkten Kontakt mit ihrer Umgebung und sind in der Lage Antigene über PRRs an ihrer Zelloberfläche oder über intrazelluläre Rezeptoren zu detektieren. Die Expression inflammatorischer Chemokin-Rezeptoren auf dendritischen Zellen ermöglicht es diesen, proinflammatorische Zytokine oder Chemokine zu binden (Cravens & Lipsky 2002). Zudem exprimieren gereifte DCs kostimulatorische Moleküle, zu denen unter anderem CD80, CD86 und CD40 gehören, welche für die Reifung naiver Lymphozyten und für eine effektive Immunantwort essentiell sind (Mayordomo et al. 1997).

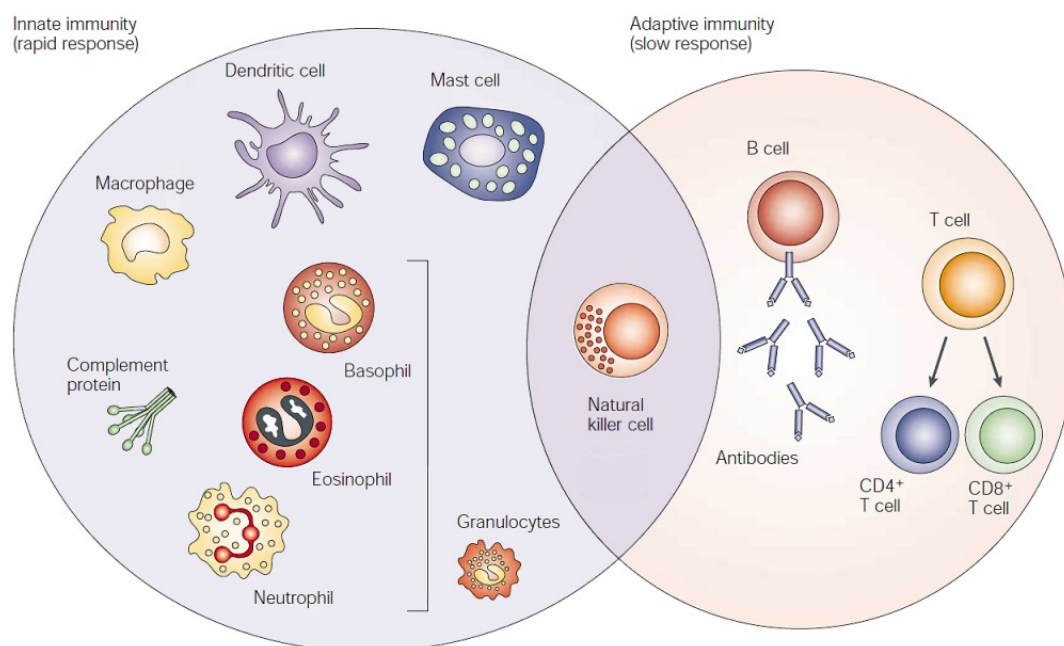


Abb. 1.1: Das angeborene und adaptive Immunsystem (verändert nach Dranoff 2004)

Das angeborene Immunsystem vermittelt eine schnelle unspezifische Abwehr und somit einen allgemeinen Schutz gegen Infektionen. Zum angeborenen Immunsystem gehören neben zellulären Komponenten wie Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen und neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten auch Komplementproteine. Die adaptive Immunantwort passt sich spezifisch an individuelle Pathogene an und ist abhängig vom Kontakt mit Pathogenen oder deren Produkten. Sie besteht aus Antikörpern, B-Zellen, sowie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Die zytotoxischen natürlichen Killerzellen werden beiden Systemen zugeordnet.

1.1.1.3 Myeloische Suppressorzellen

Die myeloischen Suppressorzellen (engl. *myeloid derived suppressor cells*, MDSC) wurden zum ersten Mal 1987 in einem murinen Lungenkrebsmodell beschrieben. Dort wurden sie als im Knochenmark entstehende Zellen klassifiziert, welche die T-Zellproliferation inhibieren (Young et al. 1987). MDSCs sind eine heterogene Population von Zellen, welche hauptsächlich aus myeloischen Vorläuferzellen und unreifen myeloischen Zellen besteht. Sie entwickeln sich aus multipotenten hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark, welche sich in die verschiedenen Formen von spezialisierten myeloischen Zellen entwickeln können. Zu diesen Zellen gehören unter anderem Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Im Knochenmark gesunder Mäuse ist der Anteil an unreifen Zellen, welche den gleichen Phänotyp wie MDSCs haben mit 20-30 % relativ hoch, jedoch haben diese Zellen keine nachweisbaren immunsupprimierenden Eigenschaften und differenzieren zu reifen myeloischen Zellen aus. In der Milz kommen diese Zellen nur in geringer Anzahl (2-4 %), vor, während sie im Lymphknoten nicht nachweisbar sind (Gabrilovich & Nagaraj 2009).

Unter pathogenen Bedingungen hingegen wird die Differenzierung von unreifen zu reifen myeloischen Zellen teilweise blockiert, so dass es zu einer Expansion der MDSC Population kommt. Verantwortlich dafür sind unter anderem die vermehrte Bildung immunsupprimierender Faktoren wie Arginase 1 (ARG1) und der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (engl. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS), ebenso wie der Anstieg an Stickstoffmonoxid, reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und Wasserstoffperoxid (Youn et al. 2012; Kusmartsev & Gabrilovich 2003).

Während es für humane MDSCs keine klar definierten Oberflächenmarker gibt, werden murine MDSCs als CD11b⁺ Gr1⁺ Zellen definiert. Dabei kann zwischen zwei Hauptpopulationen von MDSCs unterschieden werden, welche die beiden Epitope des Gr1, Ly-6C und Ly-6G, in unterschiedlicher Stärke auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (Youn et al. 2008; Kusmartsev & Gabrilovich 2003).

Die monozytären CD11b⁺ Ly-6G⁻ Ly-6C⁺ MDSCs haben stark immunsupprimierende Eigenschaften und exprimieren unter anderem hohe Mengen an ARG1 und iNOS. Vor allem die durch diese Enzyme produzierten reaktiven Stickstoffspezies sind für den supprimierenden Effekt auf CD8⁺ T-Zellen und für die Aktivierung und Vermehrung der regulatorischen T-Zellpopulation verantwortlich. Die granulozytären oder polymorphonukleären CD11b⁺ Ly-6G⁺ Ly-6C^{low} MDSCs supprimieren die antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen hauptsächlich durch die Produktion von ROS, was zu einer Desensibilisierung der T-Zellrezeptoren führt. Bei einem Großteil der zirkulierenden MDSCs handelt es sich um

granulozytäre Zellen, welchen weniger immunsupprimierende Eigenschaften zugeschrieben werden als den monozytären MDSCs (Gabrilovich et al. 2012).

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem passt sich die adaptive Immunantwort spezifisch an individuelle Pathogene an und ist abhängig von dem Kontakt mit Pathogenen oder deren Produkten. Die auf den Antigenkontakt folgende Immunreaktion wird von Lymphozyten vermittelt, welche sich in großer Anzahl im Blut, im Lymphsystem und in gereifter Form vor allem in den Lymphknoten und der Milz befinden (Madigan & Martinko 2006). Die Lymphozyten entwickeln sich aus gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzellen (engl. *common lymphoid progenitor*, CLP) im Knochenmark oder in der fetalen Leber, welche ebenso wie MDPs aus den hämatopoietischen Stammzellen des Knochenmarks hervorgehen.

B-Zellen stellen eine Population von Zellen dar, welche klonal unterschiedliche Antikörper oder Immunglobuline (Ig) sezernieren können. Diese sind ein wichtiger Bestandteil der humoralen Immunantwort. Sie vermitteln durch das Erkennen antigen-spezifischer Epitope die Immunität gegen extrazelluläre Pathogene und gefährliche lösliche Proteine wie Toxine (LeBien & Tedder 2008; Madigan & Martinko 2006). Die frühe B-Zellentwicklung wird vor allem durch die Reorganisation der Ig-Genorte der schweren (engl. *heavy*, H) und leichten (engl. *light*, L) Ketten in den VDJ (engl. *variable, diverse, joining*) Gensegmenten charakterisiert (Alt et al. 1986). Während ihrer Entwicklung exprimieren die frühen und unreifen B-Zellen neben einem prä-B-Zellrezeptor (engl. *B cell receptor*, BCR) auch Igs auf ihrer Zelloberfläche (Gauthier et al. 2002). Neugebildete autoreaktive B-Zellen werden durch negative Selektion im Knochenmark oder im peripheren Lymphsystem eliminiert (Allman et al. 2004).

Ein Großteil der sich außerhalb des darmassoziierten lymphatischen Gewebes befindlichen reifen B-Zellen sind in den Lymphfollikeln von Milz oder Lymphknoten angesiedelt. Dort aktiviert die Antigenpräsentation der B-Zellen die antigen-spezifische T-Helferzelle und regt diese zur Zytokinproduktion an. Die Zytokine führen zur Aktivierung nahgelegener antigen-spezifischer B-Zellen und zur vermehrten Sekretion antigen-spezifischer Antikörper (Madigan & Martinko 2006). Bei Menschen ohne T-Zellen fehlt die regulierende Aktivität der T-Helferzellen auf die Effektorzellen, so dass dies zu einer geringeren Antikörperantwort führt (Greaves & Brown 1973).

1.1.2.1 T-Zellen

T-Zellen sind für die antigen-spezifische zelluläre Interaktion verantwortlich und können in T-Helferzellen (T_H) und zytotoxische T-Zellen (engl. *cytotoxic T cell*, CTL) unterteilt werden. T_H -Zellen exprimieren CD4 und CTLs CD8 als Korezeptor auf ihrer Oberfläche. Neugebildete T-Zellen verlassen das Knochenmark und wandern entlang eines chemotaktischen Gradienten zum Thymus. Im Thymusparenchym durchlaufen sie sowohl eine positive als auch eine negative Selektion um die Fähigkeit zur Interaktion mit MHC-Komplexen zu prüfen und autoreaktive T-Zellen zu entfernen. Sie verlassen den Thymus als entweder für CD4 oder für CD8 positive und tolerante T-Zellen (Schwarz & Bhandoola 2006; Anderson & Takahama 2012). Für die Interaktion mit den von APCs präsentierten Peptid-MHC-Komplex besitzen T-Zellen an ihrer Zelloberfläche einen T-Zellrezeptor (engl. *T cell receptor*, TCR), der aus einer transmembranären konstanten Domäne (engl. *constant*, C) und zwei variablen (V) $V\alpha$ - und $V\beta$ - Domänen besteht. Das adaptive Immunsystem ist in der Lage annähernd jedes ihm bekannte Peptidantigen zu binden. Zwar werden komplexe Polysaccharide von TCRs nicht erkannt, können aber von B-Zellrezeptoren gebunden werden (Madigan & Martinko 2006; Zinkernagel & Doherty 1974).

T_H -Zellen wurden ursprünglich in zwei Subpopulationen, T_H1 und T_H2 , unterteilt (Mosmann et al. 1986). Die T_H1 -Zellen lösen eine proinflammatorische Immunantwort aus und aktivieren Makrophagen und andere nichtspezifische Phagozyten durch die Sekretion von Zytokinen wie $IFN-\gamma$, dem Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) und dem Tumornekrosefaktor (TNF)- α . T_H2 -Zellen hingegen spielen eine entscheidende Rolle bei der Anregung der humoralen Immunantwort, indem sie B-Zellen aktivieren und damit die Antikörperproduktion stimulieren (Coffman 2006). Mittlerweile sind weitere Subpopulationen, wie z.B. T_H17 -, T_H3 - und die follikulären T-Helferzellen (T_{FH}), hinzugekommen. So produzieren T_H17 -Zellen IL-17 und spielen scheinbar eine wichtige Rolle bei Autoimmunerkrankungen. T_H3 -Zellen sind unter anderem in der Lage durch die Sekretion vom transformierenden Wachstumsfaktor (engl. *transforming growth factor*, TGF)- β die Immunantwort zu supprimieren, während T_{FH} -Zellen grundlegend für die T-Zell-abhängige B-Zellantwort verantwortlich sind (Ma et al. 2012; Faria & Weiner 2006; Gutcher & Becher 2007). Der TCR von T_H Zellen erkennt ausschließlich Peptidantigene, welche von MHC Klasse II Molekülen präsentiert werden. Zusätzlich müssen von den APCs kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 exprimiert werden, welche mit dem CD28 Rezeptor auf der Oberfläche der T-Zellen interagieren (König et al. 1992). CD28 wird konstitutiv auf naiven T-Zellen exprimiert und

vermittelt kostimulatorische Signale, welche für die T-Zellaktivierung notwendig sind (Allison 1994).

Im Gegensatz zu den T_H-Zellen erkennen zytotoxische T-Zellen Peptidantigene nur in Verbindung mit MHC I-Komplexen, welche von allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden können (Zinkernagel & Doherty 1974). Während einer Infektion findet der erste Kontakt naiver CD8⁺ T-Zellen mit den APCs vor allem in den sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten und Milz statt. Dabei ist die Aktivierung der T-Zellen durch DCs effektiver als eine Aktivierung durch die antigenreichen Makrophagen (Hickman et al. 2008). So führt vor allem das Zusammenspiel der durch die DCs sezernierten Chemokine und der von den naiven CD8⁺ T-Zellen exprimierten Chemokin-Rezeptoren zu einer Verstärkung der Rekrutierung in der initialen Phase der Immunantwort (Zhang & Bevan 2011). Naive CD8⁺ T-Zellen können abhängig von der Stimulation entweder zu kurzlebigen Effektor- oder langlebigen Gedächtniszellen differenzieren. Faktoren wie inflammatorische Signale, Kostimulation und der Kontakt mit unterschiedlichen APCs haben einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Differenzierung zu CD8⁺ Gedächtniszellen oder zu zytolytischen CD8⁺ Effektorzellen (Gerlach et al. 2010). Nach dem Erstkontakt mit einem Antigen müssen naive T-Zellen ihren Metabolismus dramatisch umstellen. Neben einer gesteigerten Zellteilung muss auch die Aufnahme von Glukose, Aminosäuren und Eisen erhöht werden (Michalek & Rathmell 2010). Für die erfolgreiche Differenzierung müssen die T-Zellen eine Vielzahl von Signalen erhalten, welche neben der Aktivierung über die TCRs auch kostimulatorische Signale wie IL-12 und Typ I Interferone enthalten müssen (Parish & Kaech 2009).

Zytokine sind bedeutsam für die Differenzierung, Reifung und Aktivierung von naiven, Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen. So induziert IL-18 zusammen mit IL-12 unter anderem auch die IFN- γ -Produktion von CD8⁺ Gedächtniszellen (Raué et al. 2004). Die antivirale CD8⁺ T-Zellantwort wird unter anderem durch IL-33, einem Mitglied der IL-1-Superfamilie, angeregt. IL-33 wird als nukleärer Vorläufer gebildet, jedoch nach zellulärer Schädigung durch virale Infektion oder nekrotischen Zelltod freigesetzt (Moussion et al. 2008; Cox et al. 2013). IL-6 wird unter anderem von Monozyten und Endothelzellen sezerniert. Es ist an der Kontrolle verschiedener Virusinfektionen beteiligt, darunter das Herpes simplex Virus (HSV)-1 und das murine Friend Leukämie Virus (FV). Es wirkt hierbei sowohl direkt als auch indirekt auf die antivirale CD8⁺ T-Zellantwort. In CD4⁺ T-Zellen induziert IL-6 die Expression von IL-21, welches während persistierender Infektionen entscheidend für die Unterstützung der antiviralen CTL Antwort ist (Strestik et al. 2001; Murphy et al. 2008). Neben stimulatorischen Effekten können Zytokine auch supprimierend auf T-Zellen wirken. So reduziert IL-10 direkt die Proliferation und die Effektoraktivität aller T-Zellen. Es kann

indirekt die T-Zellantwort inhibieren, indem es die Antigenpräsentation und die Expression proinflammatorischer Zytokine von Makrophagen und DCs vermindert (Wilson & Brooks 2011; Liu et al. 2011). Auch TGF- β ist entscheidend für eine Verminderung der Immunantwort und das Verhindern von Schäden durch das eigene Immunsystem. Diese immunregulatorischen Effekte machen sich auch Viren wie Hepatitis B zu Nutze, um die Immunantwort zu vermindern und ihre Persistenz zu fördern (Tinoco et al. 2009).

Erkennen CD8⁺ CTLs fremde Antigene beim Kontakt mit dem Peptid-MHC Klasse I-Komplex, wandern die Granzyme und Perforine enthaltenden Granula zur Membran und werden dort freigesetzt. Dieser Prozess wird Degranulation genannt. Die Perforine lagern sich in die Membran der Zielzellen ein und bilden Poren, durch welche die Granzyme, die zur Enzymunterfamilie der Serinproteasen gehören, in die Zellen gelangen können. Dort induzieren sie über die Caspase-Kaskade die Apoptose der Zielzelle (Milstein et al. 2011; Madigan & Martinko 2006). Neben der Freisetzung von Zytotoxinen können CTLs zudem die Apoptose durch Zell-Zell-Interaktion über die Oberflächen-Expression des Fas-Liganden, welcher an den Fas-Rezeptor der Zielzelle bindet, induzieren (Hanabuchi et al. 1994; Reich-Zeliger et al. 2000). Auch sind CTLs in der Lage IFN- γ und in geringem Maße auch TNF- α und Chemokine zu synthetisieren. Letztere spielen eine wichtige Rolle bei der Migration von Immunzellen zum Ort der Infektion und der Induktion von Entzündungsprozessen in infizierten Organen (Wagner et al. 1998; Price et al. 1999; Mahalingam & Karupiah 1999).

1.2 Der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF)

Sauerstoff ist essentiell für viele metabolische Prozesse und wird unter anderem bei der oxidativen Phosphorylierung der mitochondrialen Atmungskette zur Bildung von Adenosin-triphosphat (ATP) benötigt. Sinkt die Sauerstoffkonzentration unter den Normalwert für das entsprechende Gewebe, wird dieser Zustand als Hypoxie bezeichnet. Der Energiebedarf der Zellen wird unter Hypoxie zunächst aus gespeicherten Energiereserven in Form von ATP und Kreatinphosphat und zusätzlich durch die Bildung von ATP mittels anaerober Glykolyse gedeckt. Die Energiebilanz der anaeroben Glykolyse ist jedoch vergleichsweise ineffizient und führt durch die Anhäufung von Lactat über die Zeit zu einer metabolischen Azidose (Löffler et al. 2007).

Geringe Konzentrationen von Sauerstoff und Glukose sind kennzeichnend für entzündetes und verletztes Gewebe, während die Konzentrationen von inflammatorischen Zytokinen, reaktiven Sauerstoff- und Nitratspezies, sowie von Lactat in dieser Region deutlich erhöht sind. Die Rekrutierung von myeloischen Zellen des angeborenen Immunsystems erfolgt anhand eines Sauerstoff-, Nährstoff- bzw. Zytokingradienten zum Ort der Entzündung. Um unter den spezifischen, hypoxischen Konditionen ihre Funktionalität und Vitalität aufrechtzuerhalten sind diese Zellen in erster Linie auf die ATP-Synthese durch anaerobe Glykolyse angewiesen und evolutionär an eine hypoxische Umgebung angepasst (Cramer & Johnson 2003; Cramer et al. 2003).

In einer sauerstoffarmen Umgebung werden Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF) benötigt um die Sauerstoffhomöostase zu regulieren und die transkriptionale Aktivierung der Expression von Genen, welche unter anderem Angiogenese, Erythropoiese und Glykolyse kontrollieren, zu induzieren (Cramer & Johnson 2003; Loboda et al. 2010; Wang et al. 1995).

1.2.1 Aufbau und Funktion von HIF

HIF ist ein Heterodimer aus einer sauerstoffabhängig regulierten α - und einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit. Beide gehören zur Familie der basischen-Helix-Loop-Helix (bHLH) und PER-ARNT-Sim (PAS) Transkriptionsfaktoren. PER-ARNT-Sim stehen für die homologen Drosophilagene Period (Per) und Single-minded (Sim), sowie dem Säugergen *Arylhydrocarbon-Rezeptor-Nukleärer-Translokator* (ARNT).

Es sind drei Isoformen der α -Untereinheit (HIF-1 α , -2 α und -3 α) mit sechs Spleißvarianten von HIF-1 α und HIF-3 α bei Mensch und Maus (Wang et al. 1995; Maynard et al. 2003; Ema et al. 1997), sowie drei Isoformen der β -Untereinheit bekannt (Takahata et al. 1998; Wang et al. 1995). Die Isoformen HIF-1 α und HIF-2 α sind zum heutigen Zeitpunkt deutlich besser charakterisiert als HIF-3 α . Während HIF-1 α in allen Zellen präsent ist, kommt HIF-2 α trotz

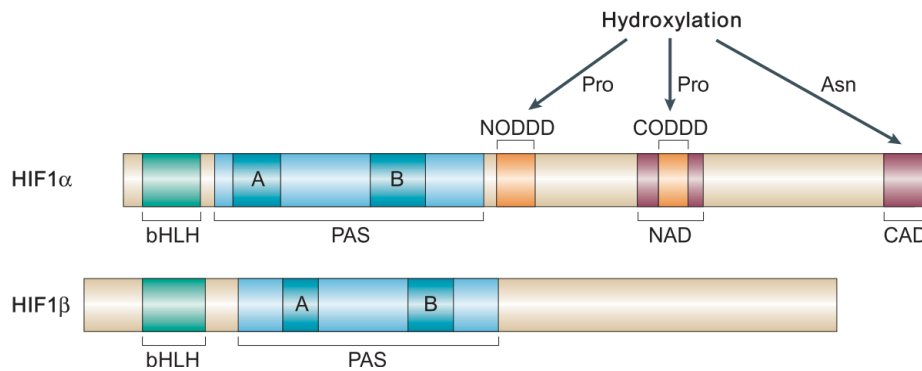


Abb. 1.2: Domänenstruktur von HIF-1α und Hif-1β/ARNT (Schofield & Ratcliffe 2004)

HIF-1α besteht aus einer basischen-Helix-Loop-Helix (bHLH) Domäne und einer PAS (Per-AHR-ARNT-Sim) Domäne, sowie N- und C-terminalen Sauerstoff-abhängigen Abbau- (engl.: *oxygen-dependent degradation domain*, NODDD bzw. CODDD) und transaktivierenden Domänen (NAD bzw. CAD). Die Hydroxylierung kann an den beiden Prolinresten durch die Prolinhydroxylasen (PHD) und am Asparaginrest durch den *Factor-inhibiting HIF* (FIH-1) erfolgen. Die konstitutiv exprimierte HIF-1β Untereinheit besitzt ebenfalls C-terminal gelegene bHLH und PAS Domänen, jedoch nur eine am C-terminalen Ende gelegene transaktivierende Domäne.

struktureller Ähnlichkeit nur in bestimmten Geweben wie dem Endothel, der Niere, der Lunge, dem Herz und dem Dünndarm vor (Gordan et al. 2007). HIF-3α wird auch als inhibitorisches PAS (iPAS) Protein bezeichnet und reguliert die HIF-1-induzierte Genexpression negativ (Makino et al. 2002; Gu et al. 1998). HIF-3α kann sowohl an die HIF-1α als auch an die HIF-1β Untereinheit binden und so die Dimerisierung der beiden Untereinheiten verhindern (Jang et al. 2005).

Die HIF-1α-Untereinheit besitzt eine molekulare Masse von 120 kDa und ist durch ihre extrem kurze normoxische Halbwertszeit von unter fünf Minuten nur bei geringen Sauerstoffkonzentrationen messbar. Die HIF-1β Untereinheit, welche auch als ARNT bekannt ist und eine molekulare Masse von 91-94 kDa besitzt, wird hingegen konstitutiv exprimiert und ist im Nukleus lokalisiert (Wang et al. 1995).

Die bHLH Strukturen am N-terminalen Ende der HIF-1α- und HIF-1β-Untereinheiten vermitteln die Bindung an die Hypoxie-responsiven Elemente (HRE) des DNA-Abschnitts des jeweiligen Zielgens und induzieren dessen Genexpression (s. Abb. 1.2). Die nachfolgende PAS-Domäne dient der Dimerisierung der Untereinheiten, während die Sauerstoff-abhängigen Abbaudomänen (engl. *oxygen-dependent degradation domain*, ODDD) und die transaktivierende Domäne der HIF-1α-Untereinheit maßgeblich deren Sauerstoff-abhängige Instabilität bedingen (Wenger et al. 2005; Fandrey 2007).

1.2.2 Regulation und Aktivierung von HIF-1

Die Regulation von HIF-1 erfolgt hauptsächlich über die Expression und Synthese der HIF-1 α -Untereinheit auf transkriptionaler, translationaler oder posttranslationaler Ebene in der Zelle, da HIF-1 β in der Zelle ein konstitutiv exprimiertes nukleäres Protein ist.

1.2.2.1 Sauerstoff-abhängige Regulation und Aktivierung von HIF-1

Unter aeroben Bedingungen im Gewebe, der sogenannten Normoxie, wird die HIF-1 α Proteinstabilität posttranslational durch Sauerstoff- und Eisen-abhängige Prolylhydroxlasen (PHD) reguliert. HIF-1 α wird in den ODDDs an den Prolinresten 402 und 564 durch die PHDs hydroxyliert. Die hydroxylierten Prolinreste werden von dem von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein (pVHL), der spezifischen Substraterkennungskomponente des pVHL-E3-Ubiquitin-Ligase Komplexes, erkannt und nach Ubiquitinierung wird die HIF-1 α -Untereinheit dem Abbau durch das 26S Proteasom zugeführt (Ivan et al. 2001; Jaakkola et al. 2001). Von den drei bisher identifizierten Prolylhydroxlasen (PHD1, PHD2 und PHD3) ist *in vivo* vor allem die PHD2-Isoform für die normoxische Modifikation von HIF-1 α verantwortlich. Sie induziert innerhalb von Minuten den Abbau der α -Untereinheit (Epstein et al. 2001). Die ebenfalls Sauerstoff-abhängige Hydroxylierung des Asparaginrestes 803 durch die Asparaginhydroxylase HIF-1-inhibierender Faktor (engl.: *factor inhibiting HIF*; FIH-1) verhindert die Bindung des p300/Creb-bindenden Proteins (CPB) an die C-terminale Trans-

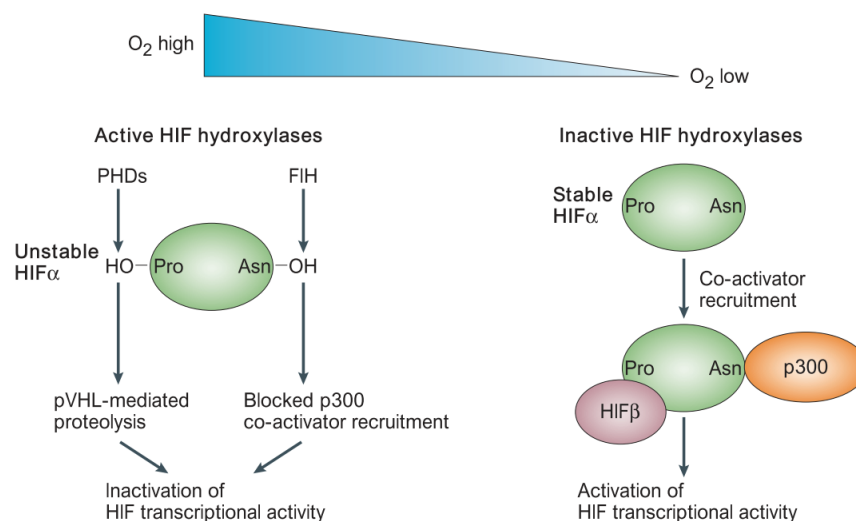


Abb. 1.3: Regulation der HIF-1 α Untereinheit durch Prolyl- und Asparaginhydroxylierung (Schofield & Ratcliffe 2004)

Unter normoxischen Bedingungen hydroxylieren die Sauerstoff-abhängigen Prolylhydroxylasen (PHD) und die Asparaginhydroxylase HIF-1-inhibierender Faktor (engl.: *factor inhibiting HIF*; FIH-1) die Prolin- und Asparaginreste des HIF-1 α . Daraus folgend vermittelt das von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein (pVHL) die Ubiquitinierung und den Abbau des HIF-1 α im Proteasom. Zudem wird die Bindung des Koaktivators p300 an die C-terminale Transaktivierungsdomäne verhindert. Unter hypoxischen Bedingungen erfolgt die Hemmung von PHDs und FIH. Dies führt zur Stabilisierung des HIF-1 α Proteins. Dieses reichert sich im Zytosol an, transloziert in den Kern, wo es Koaktivatoren rekrutiert und mit HIF-1 β das transkriptionell aktive HIF-1 Heterodimer bildet.

aktivierungsdomäne (CAD), was zu einer Hemmung der transkriptionellen Aktivierung der DNA führt (Mahon et al. 2001).

Unter hypoxischen Bedingungen schränkt der Mangel an Sauerstoff im Gewebe die Hydroxylaseaktivität ein und führt damit zu einer Hemmung der PHDs und FIH Aktivität und zur Stabilisierung der α -Untereinheit. Die Hemmung kann ebenfalls durch eine Veränderung des Eisenhaushaltes der Zelle, der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen oder der Inhibition mit NO^\bullet unter Normoxie induziert werden (Zhou et al. 2003; Metzen et al. 2003). Die Stabilisierung von HIF-1 α führt zur Akkumulation des Proteins im Zytosol und zur anschließenden Translokation in den Kern. Dort bildet sie mit der β -Untereinheit ein Heterodimer, welches als Transkriptionsfaktor HIF-1 an das HRE des Zielgens bindet. Die Bindung des Koaktivators p300/CBP an die CAD des HIF-1 α führt zur Rekrutierung weiterer akzessorischer Kofaktoren, wie SCR-1 (Steroid Rezeptor Koaktivator-1), TIF-2 (engl. *transcription intermediary factor-2*) oder dem Redoxfaktor REF-1 und zur transkriptionellen Aktivierung des Zielgens (Wenger 2002; Arany et al. 1996).

Unter andauernden hypoxischen Bedingungen wird zudem die Expression von PHD2 und PHD3 im Sinne einer negativer Rückkopplung von HIF-1 induziert, vermutlich auch, um durch erhöhte Hydroxylase-Aktivität bei Reoxygenierung des Gewebes einen schnellen Abbau des HIF-1 α -Proteins zu bewirken (Epstein et al. 2001; Berra et al. 2001).

1.2.2.2 Regulation und Aktivierung von HIF-1 durch das Immunsystem

Die HIF-1 α *messenger* RNA (mRNA) wird in den meisten Zellen unter normoxischen Bedingungen konstitutiv exprimiert, kann jedoch durch virale oder bakterielle Stimuli und inflammatorische Zytokine wie IL-1 β oder TNF α induziert werden. Vor allem die Aktivierung der Signalkaskaden nach Bindung viraler oder bakterieller Liganden an die TLRs kann in einer erhöhten HIF-1 α mRNA Expression und Translation resultieren. So führt das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS), eine Komponente der Zellwand gramnegativer Bakterien, bei Kontakt mit Monozyten oder Makrophagen über Bindung an die Zelloberflächenrezeptoren CD14 und TLR4 zur Induktion intrazellulärer Signalkaskaden. Mikrobielle Produkte von Bakterien und Parasiten werden vor allem von an der Zellmembran vorkommenden TLRs erkannt, zu dem auch das Homodimer TLR4 gehört. Die Signalkaskaden führen dabei über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (engl. *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) und dem Aktivatorprotein 1 (AP-1) unter anderem zur Induktion der HIF-1 α mRNA Expression. Die Inhibierung von NF- κ B kann so zum Beispiel den LPS-induzierten Anstieg der HIF-1 α mRNA verhindern (Frede et al. 2006). Auch virale und bakterielle Nukleinsäuren können über die in der endosomalen Membran lokalisierten TLRs zur Aktivierung von HIF-1 führen. So kann die Aktivierung von TLR7/8,

welche spezifisch einzelsträngige virale RNA binden, zur Akkumulation von HIF-1 α in myeloischen Makrophagen führen (Nicholas & Sumbayev 2009). Die Induktion der HIF-1 α mRNA und Protein Expression über TLRs führt zudem zur erhöhten Expression der Typ 1 Interferone IFN- α und IFN- β , welche in dendritischen Zellen mit einem HIF-1 α Knock-out reduziert ist (Wobben et al. 2013). Gleichzeitig ist IFN- α selbst in der Lage die HIF-1 α Transkription über den JAK-ISGF3 (Janus Kinase 1 – IFN- γ -stimulierter Genfaktor-3) Signalweg zu induzieren (Gerber & Pober 2008), während IFN- β die vermehrte Expression von TLR3 und TLR7 vermittelt (Hähnel 2003; Zhang et al. 2009).

Auch die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen führt zu einer erhöhten Expression der HIF-1 α mRNA, diese wird durch die Aktivierung der PKC (Proteinkinase C)- und MAPK (mitogenaktivierte Proteinkinase)-Signalwege vermittelt (Oda et al. 2006). Virale Infektionen können unterschiedliche Einflüsse auf die Stabilisierung und Aktivität von HIF-1 α in ihren Zielzellen haben. So kann eine gesteigerte HIF-1-Expression in Abhängigkeit vom Virus den Verlauf der Infektion sowohl hemmen als auch unterstützen. Das

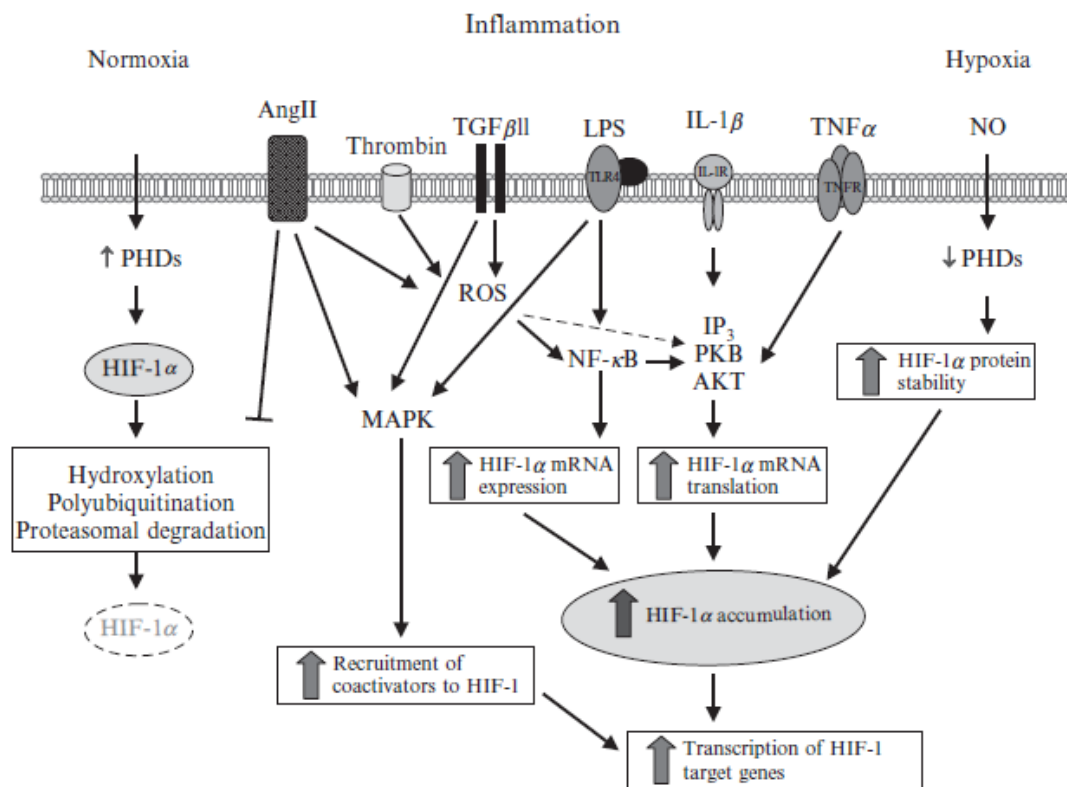


Abb. 1.4: Einfluss inflammatorischer Stimuli auf die Regulation von HIF-1 α

Bei Normoxie wird HIF-1 α Sauerstoff-abhängig von den PHDs hydroxyliert und nach Ubiquitinierung im Proteasom abgebaut. Die Hemmung der PHDs durch Hypoxie oder NO-Einwirkung resultiert in einer erhöhten HIF-1 α Proteinstabilität und direkter Konsequenz in einer gesteigerten Transkription von HIF-1 Zielgenen. Inflammatorische Bedingungen im Gewebe führen nach der nach der Bindung von Pathogen oder proinflammatorischen Zytokinen an spezifische Rezeptoren zur Aktivierung von Signalkaskaden, welche sowohl die vermehrte Expression und Translation der HIF-1 α mRNA als auch die verstärkte Rekrutierung von HIF-1 Koaktivatoren induzieren.

Respiratorische-Synzytial-Virus (RSV) führt z.B. zu einer Induktion von HIF-1 α in den Epithelzellen der menschlichen Bronchien über einen NO \cdot -abhängigen Signalweg. Der Anstieg an HIF-1 α führt zur erhöhten Bildung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), eines HIF-1-Zielgens, welches die Permeabilität des Lungenepithels erhöht und somit die Verbreitung des Virus erleichtert (Kilani et al. 2004). Im Gegensatz dazu führt die erhöhte HIF-1 α Expression bei einer Infektion mit dem Vesicular Stomatitis Virus (VSV) durch die Stimulation von Interferonen zur Limitierung des Zellschadens und der Infektion (Naldini et al. 1993). Wird die HIF-Aktivität während einer VSV-Infektion jedoch inhibiert, hat dies eine erhöhte Zytotoxizität und Virusreplikation zur Folge (de Veer et al. 2001).

Grundsätzlich führt der funktionelle Verlust von HIF-1 α zu einer fast vollständigen Inhibierung der inflammatorischen Antwort. Grund dafür ist die starke Beeinträchtigung von Zellaggregation, Beweglichkeit und Invasivität myeloischer Zellen. Zudem wird der intrazelluläre ATP-Speicher in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten drastisch reduziert (Cramer et al. 2003; Cramer & Johnson 2003; Frede et al. 2009).

1.2.3 HIF-Zielgene

Die Expression von HIF-Zielgenen variiert stark in Anhängigkeit vom Zelltyp. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind weit über 100 Zielgene mittels Microarray identifiziert worden (Benita et al. 2009). Das HIF-System spielt eine essentielle Schlüsselrolle für den Anstieg der Glykolyse und Angiogenese unter hypoxischen Bedingungen (Cramer & Johnson 2003). So ist HIF-1 unter anderem ein Hauptregulator der Sauerstoffhomöostase und reguliert Zielgene wie Erythropoietin (EPO), VEGF oder Adrenomedullin (ADM). Es induziert die Genexpression vieler Enzyme der Glykolyse, sowie zwei der Schlüsselenzyme des Glukosemetabolismus, den Glukose-Transporter-1 (Glut-1) und die Phosphoglyceratkinase (PGK)-1 (Cramer et al. 2003). Auch der A2b Adenosin Rezeptor (A2BAR) wird HIF-1 abhängig unter Hypoxie induziert, er enthält im HRE seiner Promotorregion eine funktionelle Bindungsstelle für HIF-1 (Kong et al. 2006).

Einige Zielgene werden sowohl durch HIF-1 als auch durch HIF-2 induziert, z.B. VEGF, EPO, ADM und Glut-1. HIF-1 und HIF-2 können jedoch auch gegenteilige Effekte auf Zielgene haben. Während HIF-2 die c-Myc-Aktivität und damit den Verlauf des Zellzyklus durch die Stabilisierung des c-Myc/Max-Komplexes erhöht, inhibiert HIF-1 die Funktion von c-Myc durch die Induktion des c-Myc-Antagonisten Mxi1 (engl. *max interacting protein 1*) und verursacht damit die Unterbrechung des Zellzyklus in der G1/S Phase (Löfstedt et al. 2009; Corn et al. 2005).

1.3 Das Friend Retrovirus

1.3.1 Entdeckung und Tiermodelle für Retroviren

Die Entdeckung der ersten Retroviren erfolgte Anfang des 20. Jahrhunderts durch Francis Peyton Rous. Dieser vermutete bereits 1911 die Anwesenheit des später nach ihm benannten Rous-Sarkom-Virus (RSV) in zellfreien Filtraten aus Hühnersarkomen, die in gesunden Hühnern Leukämie auslösten (Rous 1910; Rous 1911). Es folgte die Entdeckung vieler weiterer Retroviren, darunter das Maus-Mammatumovirus (MMTV) (Bittner 1936), das Affen-Immundefizienz-Virus (engl. *Simian immunodeficiency virus*, SIV) (Enders & Peebles 1954) und das murine Friend Leukämievirus (F-MuLV) (Friend 1957).

Das bereits 1978 beschriebene humane T-Zell-Leukämievirus-1 (HTLV-1) war 1980 das erste mit einer Erkrankung des Menschen assoziierte Retrovirus (Gallo 1986; Gallo & Meyskens 1978). Vier Jahre später wurde das im Vorjahr am Pasteur Institut in Paris entdeckte Retrovirus mit dem bereits 1981 beschriebenen erworbenen Immunschwäche-Syndrom (engl. *acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) in Verbindung gebracht (Brun-Vézinet et al. 1984; Barré-Sinoussi et al. 1983). Die Virusisolate von Barré-Sinoussi (1983), Popovic (1984) und Levy (1984) wurden später unter der Bezeichnung humanes Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1) zusammengefasst. Im Jahr 2011 waren weltweit etwa 34 Millionen Menschen mit HIV infiziert. Die Gesamtzahl der an HIV-infizierten Personen ist seit dem Jahr 2001 zwar um 5,6 Millionen gestiegen, die Anzahl der Neuinfektionen sank jedoch um 30 % von 3,2 auf 2,5 Millionen Menschen (UNAIDS 2011).

Das limitierende Problem in der HIV-Forschung ist die Schwierigkeit Proben direkt vom Zeitpunkt der Übertragung zu erhalten und spezifische biologische und genetische Faktoren zu kontrollieren. Im Tiermodell lassen sich nur Schimpansen mit HIV-1 infizieren. Jedoch replizieren die meisten Virusisolate nur sehr schlecht und die Tiere entwickeln innerhalb eines Jahrzehnts keine AIDS-ähnliche Erkrankung. Der Versuch durch den *knock-in* humaner Gene in die Maus die HIV-1-Replikation in den Nagern zu ermöglichen, erwies sich aufgrund vielfacher Einschränkungen als schwierig (Zhang et al. 2008). Studien über die AIDS-Pathogenese und Impfstoffe werden daher an SIV-infizierten Rhesusmakaken durchgeführt. SIV und HIV-1 sind phylogenetisch ähnlich und verursachen beide eine Depletion der CD4⁺ T-Zellen. Die Folge dieser Depletion ist eine Immunschwäche, welche zu opportunistischen Infektionen führt (Shedlock et al. 2009). Die umfassende Nutzung dieses Tiermodells ist vor allem durch Faktoren wie hohe Kosten, heterologen genetischen Hintergrund, dem Mangel an Affen-spezifischen Reagenzien und der fehlenden Möglichkeit der genetischen Modifikation begrenzt. Das Friend Retrovirus (FV) Modell hingegen ist eines der am besten charakterisierten Modelle für Retrovirusinfektionen in adulten immunkompetenten Mäusen

(Hasenkrug & Chesebro 1997). Die Infektion mit FV führt, im Gegensatz zu HIV oder SIV im Menschen oder Affen, nicht zu einer erworbenen Immunschwäche. Dessen ungeachtet weist die Auseinandersetzung des Immunsystems in der akuten Phase der FV Infektion große Ähnlichkeiten zur HIV- oder SIV-Infektion auf (Dittmer & Hasenkrug 2001). Zudem sind Mäuse, neben hoher Reproduktionsraten, leicht genetisch zu modifizieren und innerhalb eines Inzucht- oder Hybridstammes genetisch homolog oder definiert heterolog.

1.3.2 Virologische Grundlagen

Die Einteilung der Viren erfolgt in Gruppen nach ihrer Form, ihren infektiösen Eigenschaften und ihrer Wirtsspezifität. Die Klassifikation der Viren erfolgte lange Zeit nach dem Baltimore-Schema, welches die Viren nach der Organisation ihrer Genome und ihrer Vermehrungsstrategie in sieben Gruppen einteilt. Es verliert jedoch zunehmend an Bedeutung und wird immer mehr von der international verbindlichen Virus-Taxonomie nach den Statuten des ICTV (engl. *International Committee on Taxonomy of Viruses*) verdrängt (ICTV 2013; Doerfler 1996).

1.3.2.1 Struktur von Retroviren

Sowohl das Friend Virus als auch HIV gehören zu der Familie der *Retroviridae*, welche eine Hülle und ein ikosaedrisches Nukleokapsid besitzen. Sie haben einen Durchmesser von 80-120 nm und besitzen zwei positive, einzelsträngige, nicht segmentierte, lineare RNA-Moleküle mit einer Größe von 7-12 kb. Sie bilden zusammen mit der reversen Transkriptase und dem Nukleokapsid den Ribonukleoproteinkomplex (*Core*). Dort befinden sich ebenfalls die Integrasen und Proteasen. Der Komplex ist von Matrixproteinen und einer Hülle (*Envelope*) umgeben (s. Abb. 1.5).

Es wird zwischen endogenen Retroviren und infektiösen exogenen Retroviren unterschieden. Endogene Retroviren integrieren sich in das Genom ihres Wirtes und werden vertikal über

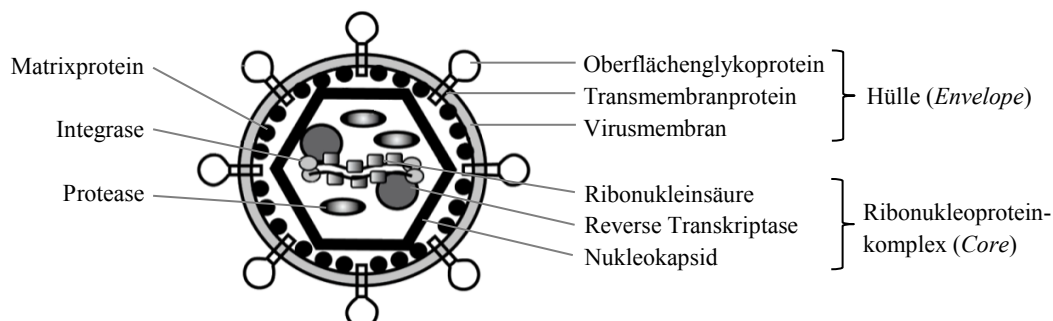


Abb. 1.5: Aufbau eines Typ-C Retrovirus bei Säugetieren am Beispiel von F-MuLV (verändert nach Maetzig et al. 2011)

Ribonukleinsäure, Reverse Transkriptase und Nukleokapsid bilden zusammen den Ribonukleoproteinkomplex (*Core*), welcher auch Integrase und Protease beinhaltet. Der Komplex ist von Matrixproteinen und einer Hülle (*Envelope*) umgeben, welche aus der Virusmembran, Transmembranproteinen und Oberflächenglykoproteinen besteht.

Keimbahnzellen übertragen. Infektiöse Retroviren enthalten in ihrem Genom alle Informationen, welche für einen Infektionszyklus mit Freisetzung infektiöser Partikel notwendig sind (Modrow et al. 2010).

Alle Retroviren enthalten in ihrem offenen Leseraster drei verschiedene Gene. Das *gag*-Gen enthält die notwendigen Informationen für die Strukturproteine (engl. *group associated antigen*, gag), der Vorstufen für die Matrixproteine, dem Nukleokapsid und der Nukleoproteinstruktur. Im *pol*-Gen sind die Gensequenzen für die Vorstufen für der reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (pol) und die Integrase enthalten. Das *env*-Gen enthält alle Informationen für die Hüllproteine (engl.: *envelope*, env) sowie die Vorstufen für die Oberflächen- und Transmembranglykoproteine (s. Abb. 1.6).

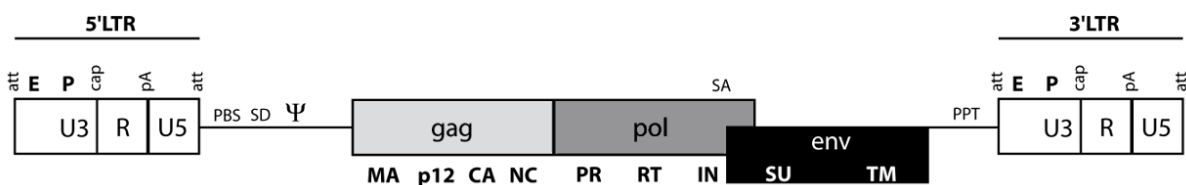


Abb. 1.6: Provirale Genomstruktur von MuLV (Maetzig et al. 2011)

Die provirale DNA kodiert für strukturelle (gag), Replikations- (pol) und Hüllproteine (env). Sie wird von zwei *long terminal repeats* (LTR) flankiert, welche aus den Abschnitten U3, R und U5 bestehen. In der 5' LTR befinden sich Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (*attachment sites*, att) und 5'RNA Capping (cap), während die 3'LTR Polypurin-Abschnitt (PTT) und die Polyadenylierungsstelle (pA) beinhalten. Vor dem offenen Leseraster befinden sich die Primerbindungsstelle (PBS), der Spleiß Donor (SD) und das Verpackungssignal (Ψ).

Zudem ist im *pol*-Gen aller Retroviren die Information für die Synthese der Virusprotease enthalten. Einfache Retroviren, wie das Friend Virus, enthalten nur die oben aufgeführten essentiellen Strukturproteine. Komplexe Retroviren, wie HIV-1 oder MMTV, haben hingegen eine unterschiedliche Anzahl an zusätzlichen Genen für regulatorische Proteine (Coffin et al. 1997; Maetzig et al. 2011).

Die Familie der *Retroviridae* lässt sich in sieben Gattungen einteilen, die in Tabelle 1.1 aufgeführt sind.

Tabelle 1.1: Taxonomie der Retroviren (ICTV 2013)

Unterfamilie	Gattung	Spezies	Beispiel
Orthoretrovirinae	Alpharetrovirus	9	RSV (Rous sarcoma virus)
	Betaretrovirus	5	MMTV (Mouse mammary tumor virus)
	Deltaretrovirus	4	HTLV-1 (Human T-lymphotropic virus)
	Epsilonretrovirus	3	WDSV (Walleye dermal sarcoma virus)
	Gammaretrovirus	17	MuLV (Murine leukemia Virus)
	Lentivirus	9	HIV-1 (Human immunodeficiency virus)
Spumaretrovirinae	Spumavirus	6	

1.3.3 Das murine Friend Leukämie Virus

Die murinen Leukämieviren gehören als Gammaretroviren zu den einfachen Retroviren und werden je nach Art ihres Virusrezeptors in unterschiedliche Subklassen gegliedert. Die ekotropen Viren sind auf die Infektion der Zellen von Mäusen oder nahe verwandter Spezies beschränkt. Die Genome xenotroper Viren replizieren sich als endogene Viren zwar in Mauszellen, können jedoch nur die Zellen anderer Spezies infizieren. Polytrope und amphotrope Viren hingegen infizieren sowohl Mauszellen als auch die Zellen anderer Spezies. Jedoch konnten amphotrope Viren bislang nur aus Wildmaus-Populationen und nicht aus Laborstämmen isoliert werden (Risser et al. 1983).

Der FV-Komplex gehört zu den ekotropen Viren und besteht aus zwei Retroviren, dem replikationskompetenten, apathogenen F-MuLV und dem pathogenen aber nicht replikationsfähigen *Spleen Focus Forming Virus* (SFFV). Durch eine größere Deletion im *gag*-Gen ist SFFV nicht in der Lage selbständig Viruspartikel zu bilden. Für die erfolgreiche Vollendung des Replikationszyklus bedarf es der Koinfektion der Wirtszelle von SFFV und F-MuLV und der Verpackung des SFFV in durch F-MuLV kodierte Viruspartikel. In suszeptiblen Mäusen führt die Verbreitung des pathogenen SFFV innerhalb von 2 Wochen zu einer chronischen Virämie, Polyzythämie und massiven Splenomegalie. Dabei steigt das Milzgewicht um das 10- bis 20-fache an. Ein bis zwei Monate nach der Infektion entwickeln die Tiere eine maligne Erythroleukämie, welche zum Tod führt (Hasenkrug & Chesebro 1997; Halemano et al. 2013). F-MuLV ist in erwachsenen Mäusen apathogen. Es ist in neugeborenen Mäusen ohne voll ausgebildetes Immunsystem jedoch in der Lage eine Splenomegalie, Anämie und Erythroleukämie zu verursachen.

Ekotrope murine Leukämieviren wie das F-MuLV können über die anorganischen Phosphat-Transporter 1 oder 2 (Pit1, Pit2) oder über den murinen kationischen Aminosäure-Transporter 1 (mCAT1) an die Zielzellen binden (Rodenburg et al. 2007; Yamaguchi et al. 2003). Zu diesen gehören Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Erythrozytenvorläuferzellen (Dittmer et al. 2002). Der Rezeptor für das SFFV ist bisher nicht bekannt.

Im Gegensatz zu den meisten akut transformierenden Retroviren wird das onkogene Potential des SFFV nicht durch ein Onkogen sondern durch eine veränderte Form des durch *env* kodierten Glykoprotein gp55 verursacht. Das *env*-Gen kodiert bei MuLV die viralen Hüllproteine gp70 und p15E, welche aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein mit 85 kDa Größe gebildet werden. Das glykosylierte Oberflächenprotein (engl.: *surface unit*, SU) gp70 ist für viele biologische Eigenschaften von MuLV wie Rezeptorerkennung, Wirtsspezifität, Rezeptor-Interferenz und Antigenität verantwortlich, während es sich beim p15E um ein nicht glykosyliertes transmembranäres Protein handelt (Hunter & Swanstrom 1990).

Das *env*-Gen des SFFV enthält jedoch eine große Deletion im offenen Leseraster, wodurch die Schnittstelle für die Teilung in Oberflächen- und Transmembranprotein fehlt. So wird gp55 als Fusionsprotein aus der N-terminalen Domäne des gp70 und der C-terminalen Domäne des p15E gebildet. Die Leserasterverschiebung, der Verlust der zytoplasmatischen Einheit sowie die gleichzeitige Bildung eines einzigartigen C-Terminus führen zusammengekommen zu dem pathogenen Verhalten des SFFV. Im Gegensatz zum typischen MuLV-Hüllprotein ist gp55 kein strukturelles Protein der Virushülle. Nur 5 % des Proteins verlässt das ER als Disulfid-gebundenes Dimer. Es gelangt nach Prozessierung im Golgi-Apparat als Dimer aus zwei 65 kDa Untereinheiten an die Zelloberfläche (Cmarik & Ruscetti 2010). Die Bindung des an der Zelloberfläche exprimierten gp55 an den Erythropoietin-Rezeptor (EPO-R) von kernhaltigen Erythrozytenvorläuferzellen (engl. *erythrocyte progenitor cells*, EPC) führt zu einer Aktivierung des EPO-R. Die Folge sind die EPO-unabhängige Proliferation und Differenzierung der EPCs. Zusätzlich kann gp55 auch den sf-Stk-Rezeptor (engl. *short form of stem-cell-kinase*) rekrutieren. Die resultierende konstitutive Aktivierung von Signalwegen führt ebenfalls zu einer Dysregulation der Proliferation, Differenzierung und des Zellüberlebens von SFFV-infizierten EPCs (Moreau-Gachelin 2008; Kabat 1989).

Die genetischen Faktoren der Wirtstiere haben einen enormen Einfluss auf die Resistenz gegen das FV. Sie wird durch mindestens sechs FV-Resistenzgene (FV 1-6) und durch mindestens vier Gene in den murinen MHC-Komplexen (H-2) vermittelt. Die FV-Resistenzgene induzieren eine nicht-immunologische Resistenz (Stoye 1998), während die MHC-Komplexe die zelluläre und humorale Immunantwort gegen das FV beeinflussen. Für letztere wurde der H-2 Locus als wichtiger Genort für die Erholung nach der Virusinfektion identifiziert. So erholen sich Mäuse mit einem H-2^{b/b}-Genotyp, zu denen der FV-resistente Stamm C57BL/6 gehört, mit einer höheren Häufigkeit als Mäuse mit H-2^{b/d}-Genotyp (Lilly 1968). Zudem tragen C57BL/6 Mäuse das nicht-immunologische Resistenzgen Fv-2, welches die polyklonale Zellaktivierung von EPCs und somit die folgende Splenomegalie limitiert (Hoatlin & Kabat 1995). Nach 2 Wochen bildet sich die Vergrößerung der Milz wieder zurück, jedoch bleiben die Tiere mit einer normalen Lebenserwartung persistierend infiziert.

1.3.3.1 Replikationszyklus von F-MuLV

Der Replikationszyklus muriner Leukämieviren entspricht dem üblichen Zyklus von Retroviren und wird in eine frühe und eine späte Phase unterteilt (s. Abb. 1.7).

Die frühe Phase beginnt mit der Bindung der Oberflächenproteine auf der Virushülle an seinen Rezeptor auf der Oberfläche der spezifischen Zielzelle. Nach dem Kontakt fusioniert das Virus mit der Wirtszellmembran und die *Core*-Struktur wird in das Zytoplasma interna-

lisiert. Die virale RNA wird durch die im Nukleokapsid bereits vorhandene reverse Transkriptase in virale dsDNA umgeschrieben. MuLV beinhaltet jedoch keine Elemente für den aktiven Import in den Kern und ist zudem von einer sehr stabilen *Core*-Struktur umgeben. Daher ist der erfolgreiche Infektionsverlauf abhängig von der Auflösung der Kernhülle und Ausführung der Mitose in der frühen Phase der Infektion. Die Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom wird durch virale Bestandteile (Integrase, Kapsid und p12), sowie Proteine der Wirtszelle vermittelt.

Nach der Integration der proviralen DNA beginnt die späte Phase der viralen Replikation mit der Transkription viraler RNA ausgehend von der U3 Region der 5' LTR (engl. *long terminal repeats*). Die virale RNA wird sowohl gespleißt als auch ungespleißt ins Zytoplasma transportiert. Die gespleißte mRNA dient als Vorlage für die Translation der Strukturproteine. Es folgt die Verpackung der ungespleißten viralen RNA und der viralen Proteine an der Plasmamembran zu einem vollständigen Viruspartikel. Die Freisetzung erfolgt über das Abschnüren der Zellmembran, der Knospung (engl. *Budding*). Das Viruspartikel enthält zu diesem Zeitpunkt noch ungeschnittene Vorläufer von Struktur- und Replikationsproteinen. Die Reifung des Virus erfolgt außerhalb der Wirtszellen in mehreren aufeinanderfolgenden

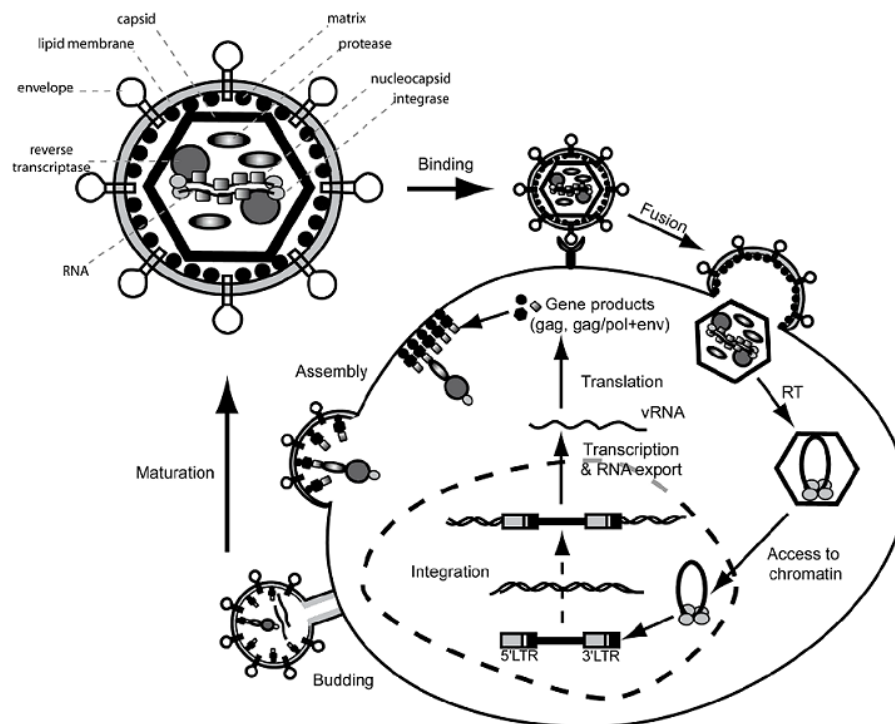


Abb. 1.7: Replikationszyklus von MuLV (Maetzig et al. 2011)

Nach der Bindung der viralen Oberflächenproteine an einen spezifischen Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle, fusioniert das Virus mit der Zellmembran und die *Core*-Struktur wird in das Zytoplasma internalisiert. Nach reverser Transkription (RT) wird die provirale DNA in das Wirtszellgenom integriert, transkribiert und in virale Proteine translatiert. Die Strukturproteine und ungespleißte virale RNA (vRNA) lagern sich an der Wirtszellmembran zusammen und werden durch Knospung (Budding) freigesetzt. Die Reifung des Viruspartikels erfolgt extrazellulär.

Schritten, welche von der viralen Protease initialisiert werden.

Die Replikation von F-MuLV findet in stabilen Virus-produzierenden Wirtszellen statt und ist nicht lytisch (Maetzig et al. 2011).

1.4 Zielsetzung

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert unter anderem die zelluläre Anpassung von dendritischen Zellen und Makrophagen an hypoxische und inflammatorische Bedingungen. So können sowohl bakterielle als auch virale Stimuli über Bindung an die Toll-like Rezeptoren eine HIF-1 vermittelte Immunantwort dieser Zellen auslösen (Zinkernagel et al. 2007). Während die Aktivierung von HIF-1 bei bakteriellen Infektionen die Immunantwort beispielsweise durch die erhöhte Expression inflammatorischer Zytokine unterstützt (Cramer & Johnson 2003), sind einige Viren dazu in der Lage die durch HIF-1 induzierten Effekte für ihre Verbreitung im Organismus zu nutzen. So führt zum Beispiel die Infektion von primären CD4⁺ T-Zellen zu einem Anstieg der HIF-1 α mRNA Expression (Selliah et al. 2007), was die Aktivierung des HIV-1 Promoters begünstigt, da diese in den infizierten Zellen HIF-1 α abhängig erfolgt (Deshmane et al. 2011).

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Aktivierung von HIF-1 in Zellen des angeborenen Immunsystems sowie den Einfluss von HIF-1 auf den Verlauf von akuter und chronischer Retrovirusinfektion näher zu bestimmen. Dafür wurden Mäuse mit einem konditionellen HIF-1 α Knock-out in den CD11c⁺ dendritischen Zellen mit dem murinen Friend Leukämie Virus infiziert. Dieses Virus bindet unter anderem an den Epo-Rezeptor von Erythrozyten-vorläuferzellen und führt zu einer vom HIF-1 Zielgen Epo unabhängigen Proliferation und Differenzierung dieser Zellen. Zudem ist das Friend Virus auch in der Lage Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten zu infizieren.

Um einen eventuellen Einfluss der partiellen HIF-1 α Defizienz auf das Immunsystem der infizierten Tiere nachzuweisen, wurden sowohl die Struktur als auch die Verteilung und die Aktivierung der verschiedenen Immunzellpopulationen in der Milz als Hauptzielorgan der Friend Virus Infektion analysiert.

Zusätzlich wurden dendritische Zellen aus dem Knochenmark naiver und FV-infizierter Tiere generiert, um den Einfluss der Virusinfektion auf die HIF-1 α mRNA und Proteinexpression als auch auf die Genexpression verschiedener Gene in den HIF-1 α defizienten dendritischen Zellen zu erforschen. Des Weiteren wurden in einem T-Zellproliferations- und Aktivierungsassay die Aktivierung und die zytotoxische Aktivität von CD8 T-Zellen nach *in vitro* Kontakt mit den dendritischen Zellen bestimmt. Dabei sollten vor allem mögliche Unterschiede in der Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen durch dendritische Zellen mit einem konditionellen HIF-1 α Knock-out erfasst werden.

2 Material

2.1 Versuchstiere

Alle verwendeten transgenen Mausstämme hatten einen C57Bl/6J Hintergrund.

Die für die Virusinfektion verwendeten Tiere weisen in $CD11c^+$ dendritischen Zellen einen konditionellen HIF-1 α Knock-out auf. Das Exon 2 des HIF-1 α Gens wird in für dieses Allel homozygoten Mäusen beidseitig von loxP-Schnittstellen flankiert (HIF-1 $\alpha^{f+/f+}$). Für den Knock-out wurden HIF-1 $\alpha^{f+/f+}$ Mäuse mit für die Cre-Rekombinase heterozygoten Tieren gekreuzt. Die Expression der Cre-Rekombinase, welche der Kontrolle des murinen Integrin α^X (CD11c) Promotors unterliegt, führt zum Verlust des Exons 2 des HIF-1 α Gens und damit zum Verlust der DNA-Bindungsdomäne. Die daraus entstehende mRNA resultiert in der Bildung eines verkürzten, nicht funktionellen HIF-1 α -Proteins. Die so generierten CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{f+/f+}$ Mäuse exprimieren das Cre in den $CD11c^+$, vornehmlich dendritischen Zellen. Die HIF-1 $\alpha^{f+/f+}$ Geschwistertiere, welche kein Cre exprimieren, dienten als Kontrollen. Die HIF-1 $\alpha^{+/f+}$ Mäuse wurden ursprünglich von Prof. Dr. Randall Johnson (University of California, San Diego) und die CD11cCre Mäuse von Prof. Dr. Boris Reizis (Columbia University Medical Center, New York) generiert (Caton et al. 2007; Ryan et al. 2000).

Für die chronische Virusinfektion wurden zudem Mäuse mit einem konditionellen HIF-1 α Knock-out in den T-Zellen verwendet. Dafür wurden HIF-1 $\alpha^{+/f+}$ Mäuse mit Tieren gekreuzt, welche heterozygot die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des murinen CD4 Promotors unterliegen. Die so generierten CD4Cre/HIF-1 $\alpha^{+/f+}$ Mäuse exprimieren das Cre in den $CD4^+$ T-Zellen (Lee et al. 2001). Da T-Zellen in der frühen Phase ihrer Entwicklung sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ sind, befindet sich der HIF-1 α Knock-out sowohl in den $CD4^+$ T-Helferzellen als auch in den $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen. Die CD4Cre Mäuse wurden uns von Wiebke Hansen (Institut für Mikrobiologie, Universität Duisburg-Essen) für die Zucht zur Verfügung gestellt.

Für die Isolation der T-Zellen wurden OT-1 Mäuse verwendet. Der T-Zellrezeptor der Mäuse enthält transgene Insertionen in den Genen der variablen V α 2 und V β 5 Regionen. Dies führt zu einem veränderten T-Zellrezeptor, welcher spezifisch das an das MHC I Molekül H2K^b gebundene Ovalbumin-Peptidfragment 257-264 (SIINFEKL) erkennt (Hogquist et al. 1994).

Die HIF-1 $\alpha^{f+/f+}$ und die CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{f+/f+}$ Mäuse wurden in den Räumen des Zentralen Tierlabors des Universitätsklinikums Essen gezüchtet. Die OT-1 Mäuse wurden von Ralph Waldschütz vom Zentralen Tierlabor zur Verfügung gestellt. Alle Tiere wurden unter speziell pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten, die für die Dauer der Versuche beibehalten

wurden. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter und waren zum Versuchsbeginn mindestens 8 Wochen alt.

2.2 Verwendete Geräte

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

Material	Hersteller
Auflichtmikroskop CK 40	Olympus
Biofuge fresco	Heraeus Instruments
CANTO II Flow Cytometer	Becton Dickinson
Celloshaker Variospeed	Renner GmbH
Centrifuge 5415 D / 5415 R	Eppendorf
Brutschrank Hera cell	Heraeus Instruments
CO ₂ Brutschrank	Thermo Scientific
ELISA-Reader Spectra Count	Packard
Epoch	BioTek
Gefrierschrank	LIEBHERR
Heizblock HTM 130 / HTM 130-6	HLC
Hypoxie-Brutschrank BB6620 CUO ₂	Heraeus Instruments
iCycler iQ, Multicolor Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad
Kühlschrank	LIEBHERR
Labofuge 400 R	Heraeus Instruments
Manuelle Pipetten (10, 100, 1000 µl)	Eppendorf
Mastercycler	Eppendorf
Microm HM 340E	Thermo Scientific
Mini Protean 3	Bio-Rad
Mini-Protean® Tetra Cell	Bio-Rad
Photometer SmartSpec 3000	Bio-Rad
Polymax 1040	Heidolph Instruments
QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotec
Schüttler Titramax 101	Heidolph

Material	Hersteller
Shandon Excelsior ES Tissue Processor	Thermo Scientific
Shandon Histocentre 2 Embedding Center	Thermo Scientific
Sorvall Centrifuge fresco	Thermo Scientific
Sterilbank HERA Safe	Heraeus Instruments
Take3	BioTek
Thermocycler Tpersonal / Tprofessional	Biometra
Tissue Flotation Bath TFB 45	Medite
Zählkammer nach Neubauer	Becton Dickinson

2.3 Verwendete Materialien

Tabelle 2.2: Verwendete Materialien

Material	Hersteller
100 bp DNA Ladder	Invitrogen
8er Kette optisch klar flacher Deckel	Sarstedt
96 Well Mikroplatte, Rundboden	BD Falcon
Annexin V Binding Buffer	BioLegend
Bechergläser	Schott
CD8a ⁺ T cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec
Cytoseal XYL	Thermo Scientific
Deckgläser	Engelbrecht
ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare
Einmalspritzen (2 ml; 5 ml; 10 ml)	B. Braun
Erlenmeyerkolben	Schott
FACS-Röhrchen	Falcon Becton Dickinson
Filter Tips (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Greiner Bio-one
FOXP3 Fix/Perm Buffer Set	BioLegend
Gel-blotting-Papiere, GB003	Schleicher & Schuell
Kanülen (G27 ¾")	Becton Dickinson
LS-Columns	Miltenyi Biotec

Material	Hersteller
Microtome Blade S35	Feather
96 Multiply® PCR Platte natur	Sarstedt
Nitrocellulose-Transfermembran, 0,2 µm Porengröße	Schleicher & Schuell
PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 to 170kDa	Thermo Scientific
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2 ml	Biozym
Pinzetten gebogen, spitz	Oehme
Pipetenspitzen (10 µl, 200µl, 1000 µl)	Sarstedt
Plastikpipetten (steril; 1 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml)	Greiner bio-one
PP-Schraubverschluss Röhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner bio-one
Quartz Spectrophotometer Cell Micro, 16.50-Q-10/8,5mm	Bio-Rad
Reaktionsgefäß (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf
Rotilabo®-Einbettkassetten	ROTH
Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf
Scheren groß, klein	Oehme
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck
SuperSignal® West Femto Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific
Zellkulturflaschen (T25,T75,T175)	Greiner bio-one
Zellkulturplatte steril (6 und 96 Vertiefungen)	Greiner bio-one
Zellsiebe (40 µm, 70 µm)	Falcon Becton Dickinson

2.4 Chemikalien und Zellkulturmedien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die im Folgenden aufgeführten Chemikalien von den Firmen Applichem, Merck, Roth und Sigma bezogen.

Acrylamid (30 %) [Bio Rad], AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol), Agarose, AIM V Medium [Gibco], Ammoniumchlorid, APS (Ammoniumpersulfat) [BioRad], Brefeldin A, Bromphenolblau, BSA (Bovines Serumalbumin) [Biochrom], DEPC (Diethylpyrocarbonat), EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), Eosin Y Lösung, Ethanol, Ethidiumbromid, Essigsäure, FCS (Fötales Kälber Serum) [Biochrom], FVD-eFluor®780 (engl.: *fixable viability dye*) [eBioscience], Glutamin, Glycerin, Glycin, GTC (Guanidiniumisothiocyanat), Isopropanol, Kaliumchlorid, Kaliumhydrogencarbonat, LPS (bakterielle Lipopolysaccharide), Mayers

Hämalaunlösung, β -Mercaptoethanol, Methanol, N-N-Dimethylformamid, Natriumacetat, Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumpyruvat, OVA (257-264) (Sequenz: SIINFEKL) [Eurogentec], Paraffin, Paraformaldehyd (PFA), Penicillin/ Streptomycin [Gibco], Phenol, Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (24:25:1), PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat), Ponceau S-Lösung, Protease-Inhibitor, Propidiumiodid [Molecular Probes], RPMI-Medium 1640 [Gibco], Salzsäure, SDS (Natriumdodecylsulfat), Streptavidin-Alexa Fluor 488 [Molecular Probes], Streptavidin-eFluor®450 [Molecular Probes], Streptavidin-PE [BioLegend], Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base), Tris-HCl (1 M, pH 9), Trypanblau, Tween20, Wasserstoffperoxid, Xylol

2.5 Häufig verwendete Puffer und Medien

Tabelle 2.3: Puffer und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
ACK-Puffer	0,15 M NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0,1 mM EDTA, pH 7,2 - 7,4
BmDC-Medium	RPMI, 10 % FCS, 4 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin, 0,06 mM β -Mercaptoethanol
AEC-Gebrauchslösung	AEC-Stock-Lösung (4 mg/ml) wird 1:20 in 0,05 M Natriumacetat angesetzt und die Reaktion mit 0,5 μl 30 % H_2O_2 /ml Lösung gestartet
AEC-Stocklösung	AEC-Tabletten in N-N-Dimethylformamid gelöst (4 mg/ml)
Blotpuffer (Western Blot)	25 mM Tris-Base, 96 mM Glycin, 20 % Methanol
Bouin's Lösung	9 % Formalin, 5 % Essigsäure, 0,9 % Pikrinsäure
FACS-Puffer	1x PBS pH 7,2, 0,1 % FCS, 0,02 % Natriumazid
Laufpuffer (Western Blot)	25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 3,5 mM SDS
Lower Buffer (Western Blot)	1,5 M Tris-Base, 13,9 mM SDS, pH 8,8
Lysepuffer (Gesamtlysat)	150 mM NaCl, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 0,5 % NP 40, 1 % Protease-Inhibitor (Protease Inhibitor erst kurz vorher hinzugeben)
MACS-Puffer	1x PBS pH 7,2, 0,5 % BSA, 2 mM EDTA
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7,2
Mus Dunni Medium	RPMI 1640, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin
4x SDS (Western Blot)	0,4 ml Aqua dest., 1,6 ml 0,5 M TRIS pH 6,8, 3,2 ml 10 % SDS, 0,8 ml β -Mercaptoethanol, 0,4 ml 0,5 % Bromphenolblau, 10 % Glycerin

Bezeichnung	Zusammensetzung
TAE (PCR)	40 mM Tris-Base, 0,11 % Essigsäure, 1 mM EDTA pH 8,0
TBS (Western Blot)	137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,6
TBS-T (Western Blot)	1xTBS; Tween20 (1:2000)
T-Zell Medium	AIM-V, 5 % FCS
Upper Buffer (Western Blot)	251 mM Tris-Base, 6,9 mM SDS, pH 6,8

2.6 Antikörper

Tabelle 2.4: Antikörper für Western Blot

Antikörper	Klon	Hersteller
β-Aktin; (Kaninchen), polyklonal anti-Maus/Mensch	polyklonal	Abcam
HIF-1α; (Kaninchen), polyklonal anti-Maus/Mensch	polyklonal	Cayman chemical
α-Tubulin; (Maus), monoklonal anti-Maus/Mensch	TU-2	Santa Cruz
HRP-konjugiert anti-Kaninchen		Sigma
HRP- konjugiert anti-Maus		Sigma

Tabelle 2.5: Fluorochrom-Charakterisierung

Bezeichnung	Abkürzung	Absorption (nm)	Emission (nm)
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	488	525
R-Phycoerythrin	PE	488	575
Propidiumiodid	PI	488	615
Peridin-Chlorophyll-Protein Komplex	PerCP	488	670
Phycoerythrin-Cy7	PE/Cy7	488	785
Allophycocyanin	APC	633	660
Allophycocyanin-Cy7 (eFluor®780)	APC/Cy7	635	785
Pacific Blue (eFluor®450)	PB	405	455

Die Antikörper (AK) für die Durchflusszytometrie wurden, soweit nicht anders aufgeführt, von BioLegend bezogen.

Tabelle 2.6: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Klon	Hersteller
Annexin V-FITC; Protein gegen alle Säugetierspezies	-	
CD3-Pacific Blue; monoklonaler Ratte anti Maus AK	17A2	
CD4-APC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	GK1.5	
CD8a-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	53-6.7	
CD8a-Pacific Blue; monoklonaler Ratte anti Maus AK	53-6.7	
CD11b-PE/Cy7; monoklonaler Ratte anti Maus AK	M1/70	
CD11c-APC; monoklonaler Hamster anti Maus AK	N418	
CD16/32 (Fcγ III/I)-purified; monoklonaler Ratte anti Maus AK	93	
CD19-FITC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	6D5	
CD25-PE/Cy7; monoklonaler Ratte anti Maus AK	PC61	
CD43-APC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	1B11	
CD49b-APC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	DX5	
CD62L-PE/Cy7; monoklonaler Ratte anti Maus AK	MEL-14	
CD69-Biotin; monoklonaler Hamster anti Maus AK	H1.2F3	
CD86-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	GL-1	
CD107a-FITC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	1D4B	
CD278-Biotin; monoklonaler Hamster anti Maus AK	C398.4A	
F4/80-FITC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	BM8	
FoxP3- eFluor®450; monoklonaler Ratte anti Maus	FJK-16s	eBioscience
Granzym B-FITC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	NGZB	eBioscience
Ly-6G/Ly-6C (Gr-1, Gr1)-PB; monoklonaler Ratte anti Maus AK	RB6-8C5	
MHC I (H-2K ^b /H-2D ^b)-FITC; monoklonaler Maus anti Maus AK	28-8-6	
MHC II (I-A/I-E) Biotin; monoklonaler Ratte anti Maus AK	M5/114.15.2	
NK1.1-PE/Cy7; monoklonaler Maus anti Maus AK	PK136	
Ter119-PE-Cy7; monoklonaler Ratte anti Maus AK	Ter-119	eBioscience

2.7 Zytokine, Zelllinien und Viren

2.7.1 Zytokine

muGM-CSF

Das murine GM-CSF wurde aus dem Überstand der Zelllinie NIH 3T3-GM-CSF gewonnen. Die Zellen wurden unserem Institut von Herrn Prof. Dr. Dittmer (Universität Duisburg Essen, Essen) zur Verfügung gestellt.

muIL-4

Das murine Interleukin-4 wurde aus dem Überstand der Zelllinie NIH 3T3-IL-4 gewonnen. Die Zellen wurden unserem Institut von Herrn Prof. Dr. Dittmer (Universität Duisburg Essen, Essen) zur Verfügung gestellt.

2.7.2 Zelllinien

Mus Dunni

Die murine Fibroblasten-Zelllinie *Mus Dunni* wurde für den Nachweis von infektiösen Zellen verwendet (Lander & Chattopadhyay 1984). Die Versuche mit diesen Zellen wurden in Kooperation mit dem Institut für Virologie der Universität Duisburg Essen durchgeführt.

2.7.3 Viren

Der B-Trope Friend Virus Komplex (FV) (Dittmer et al. 1999) wurde am Institut für Virologie der Universität Duisburg Essen aus infizierten Mäusen isoliert und unserem Institut zur Verfügung gestellt.

2.8 cDNA-Synthese, PCR und Echtzeit-PCR

Tabelle 2.7: Reagenzien und Enzyme für cDNA-Synthese, PCR und Echtzeit-PCR

Material	Hersteller
5x GoTaq® Buffer	Invitrogen
GoTaq® DNA Polymerase	Invitrogen
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
M-MLV RT 5x Reaction Buffer	Promega
MESA Green qPCR MastermixPlus for SYBR® ASSAY	Eurogentec
NTPs	Quiagen
Oligo dT	Invitrogen
Primer	Invitrogen

2.9 Oligonukleotid-Primer

Alle Primer wurden von der Firma Invitrogen bezogen und sind ausschließlich für die Identifikation von Genen mit cDNA muriner Herkunft geeignet.

Tabelle 2.8: Primersequenz, Annealing-Temperaturen und Zyklenanzahl

Zielgen	Primersequenz	PCR
ADM	5' – CGC AGT TCC GAA AGA AGT GG – 3' (<i>fwd.</i>)	60 °C
	5' – CCA GTT GTG TTC TGC TCG TCC – 3' (<i>rev.</i>)	31 <i>cyc</i>
FV env	5' – AAGTCTCCCCCGCCTCTA – 3' (<i>fwd.</i>)	60 °C
	5' – AGTGCCTGGTAAGCTCCCTGT – 3' (<i>rev.</i>)	30 <i>cyc</i>
Glut-1	5' – GAG GAG CTC TTC CAC CCT CT – 3' (<i>fwd.</i>)	60 °C
	5' – TCC TCC TGG ACT TCA CTG CT – 3' (<i>rev.</i>)	30 <i>cyc</i>
HIF-1 α	5' – GAA ATG GCC CAG TGA GAA AA – 3' (<i>fwd.</i>)	60 °C
	5' – CTT CCA CGT TGC TGA CTT GA – 3' (<i>rev.</i>)	28 <i>cyc</i>
HIF-1 α Exon 2	5' – CAT CCA GAA GTT TTC TCA CAC G – 3' (<i>fwd.</i>)	60 °C
	5' – GGC GAA GCA AAG AGT CTG AA – 3' (<i>rev.</i>)	30 <i>cyc</i>
MHC I	5' – ATG GGA GCC TCC TCC GTC CA – 3' (<i>fwd.</i>)	60 °C
	5' – AGA GCT CTG GGA GCC TGG AGC – 3' (<i>rev.</i>)	28 <i>cyc</i>
MHC II	5' – GGC GGC TTG AAC AGC CCA ATG TC – 3' (<i>fwd.</i>)	60 °C
	5' – CTG GCC ATT CCG GAA CCA GCG – 3' (<i>rev.</i>)	28 <i>cyc</i>

Zielgen	Primersequenz	PCR
ribosomales Protein	5' – AGA TGA TCG AGC CGC GC – 3' (<i>fwd.</i>)	60 °C
	5' – GCT ACC AGG GCC TTT GAG ATG GA – 3' (<i>rev.</i>)	25 <i>cyc</i>
TLR7	5' – GGC TCC TGG ATG AAA AAG TGG ATG T – 3' (<i>fwd.</i>)	60 °C
	5' – TGT CCT AGG TGG TGA CAT TCT TCA GAG – 3' (<i>rev.</i>)	28 <i>cyc</i>

2.10 Genotypisierungsprimer

Tabelle 2.9: Primersequenz, Annealing-Temperaturen und Zyklenanzahl für Genotypisierung

Gen	Primer	Primersequenz	PCR	Produktlänge
hif-1a	5' HIF1DF	5' – GGA GCT ATC TCT CTA GAC C – 3'	57 °C	wt ~ 200bp
	3' HIF1DF	5' – GCA GTT AAG AGC ACT AGT TG – 3'	34 <i>cyc</i>	DF ~ 250bp
CD4	5' CD4Cre	5' – ACG ACC AAG TGA CAG CAA TG – 3'	60 °C	CD4Cre
	3' CD4Cre	5' – CTC GAC CAG TTT AGT TAC CC – 3'	37 <i>cyc</i>	~350bp
CD11c	5' CD11cCre	5' – ACT TGG CAG CTG TCT CCA AG – 3'	63 °C	CD11cCre
	3' CD11cCre	5' – GCG AAC ATC TTC AGG TTC TG – 3'	35 <i>cyc</i>	~ 313 bp
	5' pos. control	5' – CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG – 3'		Kontrolle
	3' pos. control	5' – GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT – 3'		~ 200 bp

3 Methoden

3.1 Tierversuche

3.1.1 Genotypisierung

Die Mäuse wurden im Alter von etwa einem Monat abgesetzt und kurze Zeit später mit Ohrlöchern markiert. Das dabei entnommene Gewebe wurde für die Ermittlung des Genotyps genutzt. Die Gewebeproben wurden für mindestens eine Stunde in 300 µl 50 mM NaOH bei 100 °C erhitzt. Anschließend wurde 30 µl 1 M Tris-HCL zu den Proben pipettiert, diese gut durchmischt und die Gewebereste abzentrifugiert. Die aus den Zellen freigesetzte genomische DNA wurde für die Genotypisierungs-PCR eingesetzt. Es wurden 2,5 µl genomische DNA zu 22,5 µl des, wie in Tabelle 3.1 beschrieben zusammengesetzten, Mastermixes gegeben. Die Primer für CD11cCre und dessen Positivkontrolle wurden zusammen in einem Ansatz pipettiert. Die Proben wurden initial für 3 min bei 96 °C denaturiert, es folgten in gewünschter Zyklenzahl die Denaturierung bei 96 °C für 1 min, das Annealing bei der Primerspezifischen Temperatur für 1 min und die Elongation bei 72 °C für 3 min (siehe Tabelle 2.9). Die abschließende Synthese fand bei 72 °C für 10 min statt. Für die CD4Cre PCR wurde ein alternatives Protokoll verwendet. Nach der 10minütigen Denaturierung bei 96 °C schlossen sich 10 Zyklen mit 30 s bei 96 °C, jeweils 1,5 min bei 60 °C und 72 °C an. Daran anschließend folgten weitere 27 Zyklen für 15 s bei 96 °C, 45 s bei 60 °C und 1,5 min bei 72 °C. Die amplifizierte DNA wurde auf ein 2%iges Agarosegel mit 0,07 ppm Ethidiumbromid aufgetragen und das PCR-Produkt nach der Gelelektrophorese anhand der DNA-Größenstandards unter UV-Licht identifiziert.

Tabelle 3.1: Mastermix für Genotypisierung

22,5 µl	eingesetzter Mastermix
5,0 µl	5x Puffer
2,0 µl	dNTP
0,5 µl	je Primer
14,5 µl	Wasser
0,05 µl	GoTaq

3.1.2 Infektion

Die B-trope FV-Stammlösung wurde aus infizierten Balb/c-Mäusen gewonnen. Diese wurden mit 3000 SFFU FV-B eines Stabilats mit bekannter Viruskonzentration infiziert und nach 12 bis 14 Tagen getötet. Aus den Homogenat aller Milzen wurde eine 15%ige Milzzellsuspension in PBS mit 2 mM EDTA hergestellt und bei -80 °C gelagert. Die Aufarbeitung der entnommenen Organe erfolgte zügig auf Eis.

Zur Ermittlung der Viruskonzentration wurden Mäuse mit verschiedenen Verdünnungen des Milzhomogenats intravenös (i.v.) infiziert und die Milz nach 14 Tagen entnommen. Mit Hilfe der Bouin's Lösung wurden durch die FV Infektion entstandene maligne Zellhaufen auf der Milz gefärbt. Die Anzahl dieser Foci ergab die Viruskonzentration in *Spleen Focus Forming Units* (SFFU).

Für die Infektion der Versuchsmäuse mit dem FV wurde das bei -80 °C gelagerte Aliquot des FV-infizierten Milzzellhomogenats mit sterilem PBS auf die gewünschte Viruskonzentration verdünnt. Es wurden 20000 SFFU für die akute Infektion und mit 40000 SFFU für die chronische Infektion i.v. über eine G25-Kanüle in eine laterale Schwanzvene der Versuchstiere injiziert.

3.1.3 Organentnahme

Zur Organentnahme wurden die Tiere durch Genickbruch getötet und in Rückenlage eröffnet. Die Peritonealhaut der linken Flanke wurde mit einer Pinzette angehoben und eine kleine Öffnung hineingeschnitten, um die parallel zum letzten Rippenbogen liegende Milz zu entnehmen. Diese wurde mit einer stumpfen Pinzette herausgehoben und die beiden Blutgefäße durchtrennt. Anschließend wurde die Milz in eine 6-Well-Zellkulturplatte mit PBS auf Eis gelegt. Zur Gewinnung von Knochenmark wurden die Hinterläufe von Mäusen präpariert. Dazu wurden in Alkohol desinfizierte chirurgische Scheren und Pinzetten benutzt. Die Haut wurde entlang des Hinterlaufs eröffnet und von der darunter liegenden Muskulatur abgelöst. Die Knochen wurden vollständig von Muskeln und Sehnen befreit und nach dem Durchtrennen des Fußgelenkes und auf Höhe des Hüftknochens entnommen. Die so freipräparierten Ober- und Unterschenkelknochen wurden anschließend in einer mit PBS gefüllten 6-Well-Zellkulturplatte auf Eis gelagert.

3.2 Herstellung von Milz- und Knochenmarksuspensionen

Durch die Epiphysenöffnung der entnommenen Knochen wurde das Knochenmark aus Femur und Tibia mit ca. 5 ml PBS und einer G27 $\frac{3}{4}$ “ Kanüle versehenen 5 ml Spritze ausgespült. Das so gewonnene Knochenmark wurde gesammelt und vorsichtig resuspendiert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten.

Die entnommenen Milzen wurden mit dem Stempel einer 2 ml Spritze durch ein 70 μ m Zellsieb zerrieben und dieses mit 10 ml PBS gespült, um eine Einzelzellsuspension zu generieren. Von allen Suspensionen wurde eine Zählprobe entnommen und die Suspension für 5 min mit 1500 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit Medium auf die jeweilige gewünschte Zellzahl pro ml eingestellt.

3.3 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung von Zellzahlen wurde die Einzelzellsuspension mit 0,4 % Trypanblau 1:10 verdünnt und in einer Neubauerkammer gezählt. Mit Trypanblau lassen sich tote Zellen anfärben. Für die Zellzahlbestimmung wurden nur lebende Zellen gezählt.

3.4 Zellkultur

Alle Zellen wurden, soweit nicht anders beschrieben, in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Umgebung kultiviert.

3.4.1 Dendritische Zellen aus dem Knochenmark

Zur Generierung von aus dem Knochenmark gewonnenen dendritischen Zellen (engl.: *bone marrow-derived dendritic cells*, BmDC) wurden die aus dem Knochenmark von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ und CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ entnommenen Zellen mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro Vertiefung in einer 6-Well-Zellkulturplatte in 1 ml BmDC-Medium mit 5 ng/ml GM-CSF und 1 ng/ml IL-4 kultiviert. Alle zwei Tage wurden 1 ml Medium durch frisches Medium mit Zytokinen ersetzt. Die BmDCs wurden für den T-Zellproliferationsassay nach sieben Tagen und für die RNA- und Proteinisolierung nach acht Tagen in den Versuch genommen (Sallusto & Lanzavecchia 1994).

3.4.1.1 Versuchsbedingungen für BmDCs

Die Inkubationsdauer der zu BmDCs ausdifferenzierten Zellen unter Normoxie und Hypoxie (3 % O₂) betrug für nachfolgenden Proteinnachweis vier Stunden und für die mRNA sechs Stunden.

3.5 Magnetische Zellsortierung

Die Magnetische Zellsortierung (engl.: *magnetic activated cell sorting*, MACS) ermöglicht es, bestimmte Zellpopulationen aus einem heterogenen Zellgemisch zu isolieren, dabei wird zwischen positiver oder direkter bzw. negativer oder indirekter Isolierung unterschieden.

Bei der positiven Selektion werden die gewünschten Zielzellen direkt mit spezifischen Antikörpern markiert, an welche sogenannte MicroBeads gebunden sind. MicroBeads sind Magnetpartikel mit einer Größe von ca. 50 nm, welche aus Eisenoxid mit einer Polysaccharid-Umhüllung bestehen. Diese Partikel sind biologisch abbaubar und nicht dauerhaft an die Zellen gebunden. Nach der Inkubation der Zellen mit dem Antikörper wird die Gesamtzellsuspension auf eine Separationssäule pipettiert, welche sich in einem starken Magnetfeld befindet. Das Magnetfeld hält die markierten Zellen beim Spülen mit Puffer in der Säule zurück, während die unmarkierten Zellen passieren. Anschließend wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die markierten Zielzellen eluiert (s. Abb. 3.1, A).

Bei der negativen Selektion werden alle Zellen, die nicht der gewünschten Zellpopulation angehören, von einer biotinylierten Erstantikörpermischung gebunden und anschließend indirekt durch Anti-Biotin MicroBeads markiert. Beim Spülen passieren die unmarkierten Zielzellen ungehindert die Säule, während die restlichen Zellen im Magnetfeld der Säule zurückgehalten werden (s. Abb. 3.1, B). Die indirekte Selektion hat gegenüber der direkten Selektion den Vorteil, dass die isolierten Zellen durch den Antikörper weder markiert noch voraktiviert werden. Diese Art der Selektion wird auch Abreicherung oder Depletion genannt.

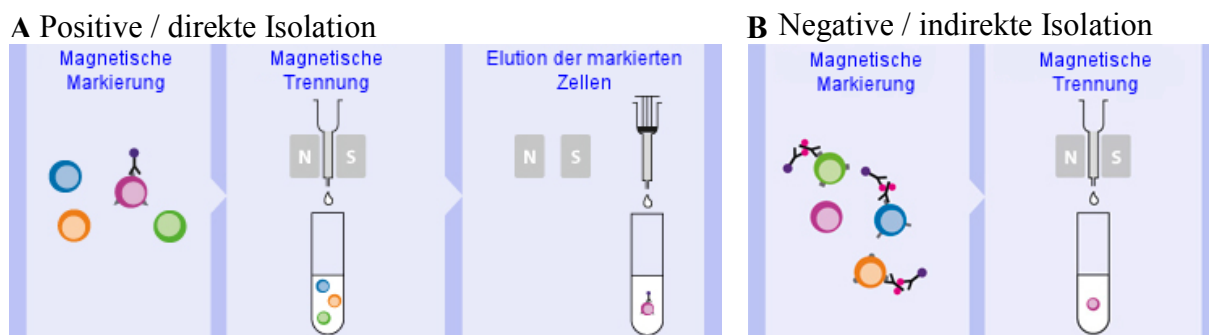


Abb. 3.1: Verschiedene Möglichkeiten der magnetischen Zellsortierung (Miltenyi Biotec 2013)

(A) Bei der positiven, direkten Isolation werden Zielzellen mithilfe von an Magnetpartikel gebundene Antikörper markiert. Die Gesamtzellen werden auf eine in einem Magnetfeld befindliche Separationssäule aufgetragen. Während die unmarkierten Zellen die Säule ungehindert passieren, werden die markierten Zielzellen im Magnetfeld zurück gehalten. Diese können nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld eluiert werden. (B) Bei der negativen, indirekten Isolation werden alle Nicht-Zielzellen durch an Magnetpartikel gebundene Antikörper markiert. Beim Auftragen auf die sich in einem Magnetfeld befindende Separationssäule werden alle markierten Zellen in der Säule zurückgehalten. Die Zielzellen passieren ungehindert die Säule und können direkt aufgefangen werden.

3.5.1 Isolation von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten

Die aus der Maus entnommene Milz wurde in einer 6-Well-Zellkulturplatte platziert und ein- bis zweimal mit jeweils 5 ml ACK-Puffer, einem Erythrozyten-Lysepuffer, gespült. Dafür wurde eine 5 ml Spritze mit einer im 90° Winkel gebogenen G27 3/4“ Kanüle versehen. Der Puffer wurde mit der Kanüle langsam in die Milz injiziert, bis diese sich aufblähte. Die Flüssigkeit wurde anschließend mit einer stumpfen Pinzette herausgedrückt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die Milz sich vollständig entfärbt hatte. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 15 ml Röhrchen überführt, zum Abstoppen der Lyse-Reaktion mit PBS aufgefüllt und bei 1500 rpm bei 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml AIM V Medium mit 5 % FCS resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 1×10^8 Zellen in ein neues 15 ml Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert. Die Isolation der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen erfolgte über die negative Selektion. Dafür wurde das Pellet in 300 µl MACS Puffer ($30 \mu\text{l}/1 \times 10^7$ Zellen) und 100 µl des Biotin-Cocktails ($10 \mu\text{l}/1 \times 10^7$ Zellen) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 300 µl MACS Puffer und 200 µl MicroBeads hinzugegeben und die Suspension weitere 15 min inkubiert. Nach dem Auffüllen des Röhrchens mit MACS-Puffer wurde die Suspension bei 1500 rpm bei 4 °C für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen.

Die Zellsuspension wurde durch ein 40 µm Zellsieb auf eine mit 3 ml Puffer vorgespülte Säule gegeben, welche sich in einem starken Magnetfeld befand. Die Säule wurde mit 3x3 ml MACS-Puffer gespült und die eluierte Fraktion mit den unmarkierten CD8⁺ T-Zellen aufgefangen. Nach der Isolation wurden die Zellen gezählt und auf 1×10^7 Zellen/ml in AIM V Medium mit 5 % FCS eingestellt.

3.6 T-Zellproliferations- und Aktivierungsassay

Mit dem T-Zellproliferations- und Aktivierungsassay ist es möglich, die Aktivierung und die zytotoxische Aktivität von CD8 T-Zellen nach *in vitro* Kontakt mit dendritischen Zellen (DCs) bestimmen. Die Präsentation von Peptiden an der Zelloberfläche und die Aktivierung der DCs kann dabei sowohl durch Infektionen, genetische Veränderungen oder Stimulation beeinflusst werden. Die für den Assay eingesetzten CD8⁺ T-Zellen aus OT-1 Mäusen besitzen einen veränderten T-Zellrezeptor, der spezifisch das an den MHC I Komplex gebundene SIINFEKL Fragment des Ovalbumins (OVA (257-264)) erkennt. Die aus dem Knochenmark differenzierten oder direkt isolierten DCs wurden mit diesem OVA-Peptidfragment beladen und nach der Inkubation in einem Verhältnis von 1:10 mit den CD8⁺ T-Zellen kokultiviert.

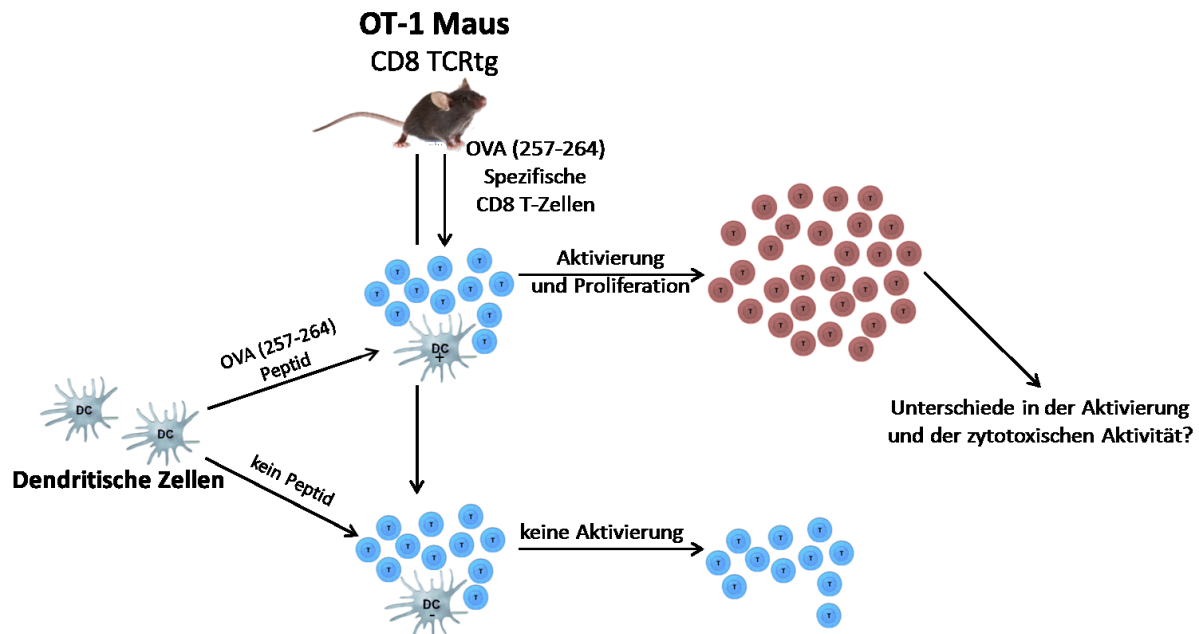


Abb. 3.2: Schematischer Aufbau des T-Zellproliferations- und Aktivierungsassays

Mit dem Ovalbumin-Peptidfragment OVA (257-264) beladene dendritische Zellen (DC) werden mit $CD8^+$ T-Zellen aus OT-1 Mäusen kokultiviert. Diese T-Zellen besitzen einen veränderten T-Zellrezeptor, welcher spezifisch den MHC I - OVA (257-264) - Peptidkomplex erkennt. Die Bindung des T-Zellrezeptors an das von den DCs präsentierte Peptidfragment führt zu einer Aktivierung und Proliferation der T-Zellen. So ist es möglich Unterschiede in der Aktivierung und zytotoxischen Aktivität der T-Zellen durch die DCs *in vitro* zu ermitteln. Die DCs können in ihrer Aktivität durch Infektionen, genetische Veränderungen oder Stimulation unterschiedlich beeinflusst werden. Nicht oder mit einem anderen Peptid beladene DCs führen nicht zur Aktivierung der T-Zellen.

Die folgende Bindung des T-Zellrezeptors an das von DCs präsentierte Peptidfragment führt zur Aktivierung und Proliferation der T-Zellen (Abb. 3.2).

Vor Versuchsbeginn wurden die für sieben Tage ausdifferenzierten BmDCs für 2-3 h mit $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ des OVA (257-264) Peptidfragments inkubiert und nach Ende der Inkubationszeit mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml T-Zell-Medium aufgenommen, gezählt und auf 5×10^4 Zellen/ml eingestellt. Jeweils $100\text{ }\mu\text{l}$ der Zellsuspension pro Vertiefung wurde in einer 96-Well-Flachbodenplatte ausgesät. Anschließend wurden die aus OT-1 Mäusen isolierten T-Zellen auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt und $100\text{ }\mu\text{l}$ der T-Zellsuspension zu den dendritischen Zellen pipettiert.

Die Zellen wurden für 48 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und $5\text{ }\%$ CO_2 kokultiviert, bevor sie geerntet wurden. Es wurden die Zellen aus jeweils zwei Vertiefungen pro Färbung für die FACS Messung und aus jeweils drei Vertiefungen für die RNA Isolation vereinigt.

3.7 Nachweis von infektiösen Zellen in der Milz ("Infectious Center Assay")

Um die Anzahl der Friend Virus-infektiöser Zellen in der Milz zu bestimmen, wurde eine Zellsuspension des zu untersuchenden Gewebes aus FV-infizierten Mäusen hergestellt (siehe Abschnitt 3.2). Dafür wurde eine Verdünnungsreihe der Milzzellsuspension mit *Mus Dunni*-Zellen als Indikatorzellen koinkubiert. Durch Zell-Zellkontakte werden die *Mus Dunni*-Zellen von den infektiösen Zellen infiziert und geben das Friend Virus durch Teilung an ihre Tochterzellen weiter, dabei entsteht ein Virus-Focus. Mittels Antikörper- und Substratreaktion können diese Foci angefärbt werden. Der FV-spezifische Antikörper AK720, welcher an das *env*-Protein des murinen Leukämie Virus (MuLV) bindet, wird von einem HRP (engl.: *Horseradish peroxidase*)-gekoppelten Zweitantikörper gebunden. Das HRP setzt das lösliche Substrat AEC in ein wasserunlösliches rotes Produkt um, die dabei entstanden Punkte markieren auf dem Zellrasen die Virus-Foci. Anhand der Verdünnungsreihe und der Gesamtzellzahl konnte anschließend die Anzahl der infektiösen Zellen für jede Milz bestimmt werden.

Am ersten Tag wurden in einer 6-Well-Zellkulturplatte $6,6 \times 10^3$ Indikatorzellen in 3 ml Medium ausplattiert (RPMI 1640, 10 % FCS, 0,5 % Penicillin/Streptomycin). Am zweiten Tag wurde mit der auf 1×10^8 Zellen/ml eingestellten Milzzellsuspension eine Verdünnungsreihe von 10^2 bis 10^7 Zellen hergestellt. Diese wurden auf die Indikatorzellen gegeben und für drei Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Umgebung kokultiviert. Alle folgenden Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Nach drei Tagen wurde das komplette Medium verworfen und die Zellen für 5 min mit 95 % Ethanol fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit PBS und mit PBS mit 0,1 % BSA gewaschen, anschließend wurden 700 µl des ersten Antikörpers AK720 als Hybridomaüberstand in jede Vertiefung pipettiert und die Platten für 2h inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Vertiefungen mit PBS mit 0,1 % BSA wurden 700 µl des zweiten Antikörpers in einer Verdünnung von 1:500 in PBS mit 0,1 % BSA in jede Vertiefung gegeben. Die Inkubationsdauer betrug 90 min. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurden 2 ml der frisch angesetzte Substratlösung AEC pro Vertiefung zugegeben und 20 min im Dunkeln inkubiert. Das AEC wurde abgenommen, die Platten erneut gewaschen und über Nacht getrocknet.

Nach der Zählung der Foci wurde deren Mittelwert pro Verdünnung und Vertiefung berechnet und auf die Gesamtanzahl der Milzzellen pro Maus hochgerechnet, um die Gesamtzahl infektiöser Zellen pro Milz oder pro Millionen Milzzellen zu erhalten.

3.8 Durchflusszytometrie

Die 1968 von Wolfgang Göhde entwickelte Durchflusszytometrie wird im Laboralltag häufig als FACS[®] (engl.: *fluorescence activated cell sorting*) bezeichnet. Mithilfe eines Durchflusszytometers können durch die Verwendung spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper Oberflächenstrukturen oder intrazelluläre Proteine in heterogenen Zellpopulationen identifiziert, charakterisiert und quantifiziert werden. Einige Durchflusszytometer können die markierten Zellen zeitgleich sortieren, so dass diese z.B. in der Zellkultur weiterverwendet werden können. Die meisten handelsüblichen FACS-Geräte sind entgegen ihres Namens jedoch reine Durchflusszytometer und können Zellen mit einem Durchmesser von 1 – 15 µm erfassen.

Die Zellen werden im Durchflusszytometer zuerst in der Durchflusszelle durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt, so dass nur eine Zelle zur gleichen Zeit den Laser passiert. Dabei wird das Licht des Lasers von der Zelle in sämtliche Richtungen abgestrahlt und von zwei unterschiedlichen Detektoren erfasst. Diese geben bereits ohne Antikörpermarkierung Aufschluss über Größe und Komplexität der Zellen. Das Vorwärtsstreulicht (engl.: *forward scatter*, FSC) bezeichnet die Menge an Licht, die in gerader Richtung gestreut wird und sich proportional zu der Größe der Zellen verhält. Das Seitwärtsstreulicht (engl.: *side scatter*, SSC) misst die Lichtbrechung im Winkel von 90°, welche mit Zunahme der Granularität und Komplexität der Zellen ansteigt. Größe und Komplexität der gemessenen Zellen stehen im relativen Verhältnis zueinander, können jedoch nicht dazu genutzt werden die exakte Größe der Zellen zu bestimmen.

Für die Analyse bestimmter Zielzellen werden Fluoreszenz-markierte Antikörper verwendet. Die Elektronen der an die Antikörper gekoppelten-Fluorochrome werden bei Passage eines Lasers mit geeigneter Wellenlänge angeregt und auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem strahlenlosen Übergang zu einem niedrigeren Niveau fallen die Elektronen unter Emission von Photonen, der sogenannten Fluoreszenz, wieder auf ihr Ursprungsniveau zurück. Da die Energie des emittierten Photons in der Regel geringer ist als die des absorbierten Photons, erfolgt die Emission bei einer höheren Wellenlänge als der des Anregungslichtes. Die Fluoreszenzmessung erfolgt, ebenso wie das Seitwärtsstreulicht, im Winkel von 90°. Die Lichtsignale werden dabei mit Hilfe semipermeabler Spiegel, welche nur das Licht einer bestimmten Wellenlänge auf den entsprechenden Spannungsdetektor lenken, gemessen. Je mehr fluoreszenzmarkierte Antikörper eine Zelle gebunden hat, desto stärker sind das detektierte Spannungssignal und die Fluoreszenzintensität. Verschiedene Laser und Filter in einem Durchflusszytometer ermöglichen die Detektion unterschiedlicher

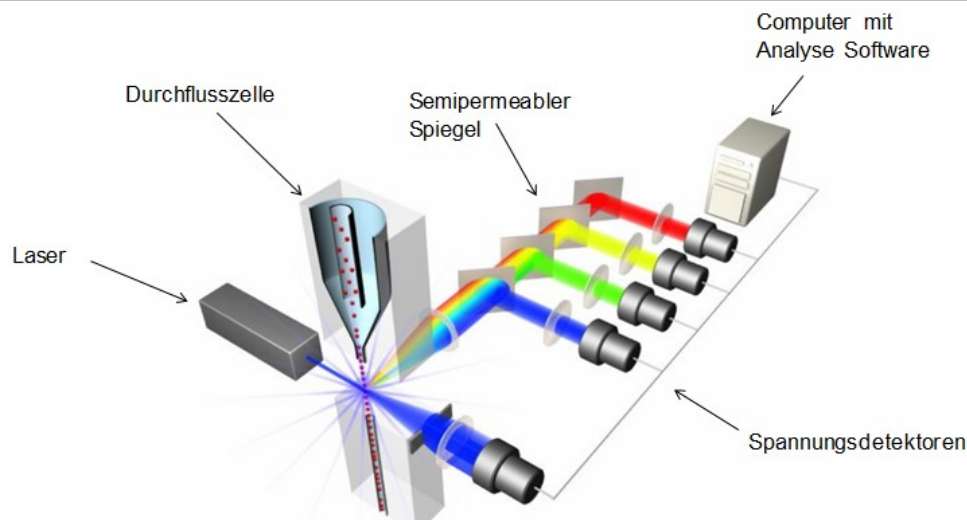


Abb. 3.3: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers (Life Technologies Corporation 2013)

Im Durchflusszytometer werden die zu analysierenden Zellen zuerst in der Durchflusszelle vereinzelt. So passiert jeweils nur eine Zelle zur gleichen Zeit das Laserlicht, welches von der Zelle in sämtliche Richtungen abgestrahlt wird. Das Licht, welches in gerader Richtung gestreut wird, wird direkt von einem Spannungsdetektor erfasst, während die gleichzeitige Fluoreszenzmessung im Winkel von 90° erfolgt. Semipermeable Spiegel, die nur bestimmte Lichtwellenlängen passieren lassen, lenken das Licht auf den entsprechenden Spannungsdetektor. Die Aufzeichnung und Auswertung aller gemessenen Spannungssignale erfolgt mittels spezieller Analyse-Software an einem Computer.

Fluoreszenzfarbstoffe mit ähnlicher Anregungs-, aber unterschiedlicher Emissionswellenlänge.

Die Auswertung der Daten erfolgt mit einem speziellen Durchflusszytometrie-Programm anhand von zweidimensionalen Punktgraphen (engl.: *dot plot*), welche Rückschlüsse auf die Zelleigenschaften zulassen. Dabei ist es möglich, Zellen anhand ihrer Größe und Komplexität aufzutrennen, oder auch mehrfach markierte Zellen in negative, einfach oder doppelt positive Population einzuteilen und zu charakterisieren. Der prozentuale Anteil jeder Population kann durch das Computerprogramm ermittelt werden.

Für die Durchflusszytometrie-Färbung wurden die Zellen abhängig von der Art der Färbung in FACS-Puffer oder in anderen speziellen Puffern aufgenommen. Der normale FACS-Puffer enthält 0,02 % Natriumazid und 0,1 % fötales Kälberserumalbumin. Der Puffer ist dadurch antibakteriell und verhindert gleichzeitig die Verklumpung der Zellen, die erhöhte unspezifische Bindung von Antikörpern und die Internalisierung von Oberflächenmolekülen. Die Fluoreszenzeigenschaften der Zellen wurden mit einem CANTO II Durchflusszytometer von Becton Dickinson gemessen und mit dem FACS Diva Analyseprogramm von Becton Dickinson analysiert und ausgewertet.

3.8.1 Färbung von Oberflächenproteinen

Für die Färbung von Oberflächenproteinen wurden 2×10^6 Zellen der wie in Abschnitt 3.2 beschrieben hergestellten Milzzellsuspension oder die Zellen von jeweils zwei Vertiefungen pro Probenansatz aus dem T-Zellproliferationsassay in eine 96-Well-Rundbodenplatte pipettiert. Die Platte wurde für 5 min mit 1500 rpm bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 50 µl FACS-Puffer und konjugierten Antikörper aufgenommen und 15 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Antikörper wurden wie in Tabelle 3.2 angegeben verdünnt. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen.

Bei biotinylierten Antikörpern erfolgte ein weiterer Färbeschritt mit einem an Streptavidin gekoppelten Fluorochrom in 50 µl FACS Puffer für 15 min im Dunkeln auf Eis. Streptavidin-Pacific Blue wurde in einem Verhältnis von 1:1000 verdünnt, Streptavidin-AF488 in einem Verhältnis von 1:800.

Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Milzzellen auf ein Messvolumen von 200 µl gebracht und 0,5 µl Propidiumiodid zur Markierung toter Zellen hinzugegeben. Die Messung der T-Zellen erfolgte aufgrund der geringeren Zellzahl in einem Volumen von 110 µl FACS-Puffer mit ebenfalls 0,5 µl Propidiumiodid pro Probe. Alle Proben wurden umgehend in der Platte im Durchflusszytometer analysiert.

Tabelle 3.2: Eingesetzte Oberflächenantikörper, deren Zielzellen und Verdünnung

Antikörper	Markierte Zellpopulation	Verdünnung
CD3	T-Zellen, Natürliche Killer T-Zellen (NKT)	1:800
CD4	T-Helferzellen	1:800
CD8a	Zytotoxische T-Zellen (CTL)	1:800
CD11b	Zellen der myeloischen Reihe	1:400
CD11c	Vor allem auf Dendritische Zellen, aber auch auf Makrophagen, Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen	1:400
CD19	B-Zellen	1:800
CD25	In Kombination mit CD4 ein Marker für regulatorische T-Zellen	1:200
CD43	u.a. an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt	1:400
CD49b (DX5)	NK-Zellen, NKT-Zellen	1:800
CD62L	L-Selektin; Homing-Marker für Lymphozyten	1:400
CD69	Früher Aktivierungsmarker für T-Zellen, Aktivierungsmarker für NK-Zellen	1:600

Antikörper	Markierte Zellpopulation	Verdünnung
CD86	Aktivierte Antigenpräsentierende Zellen	1:400
CD107a	Degranulierungsmarker, wird auf T- und NK-Zellen exprimiert	1:200
CD278 (ICOS)	Induzierbares kostimulatorisches Molekül (ICOS), wird nur auf aktivierten T-Zellen exprimiert	1:400
F4/80	Makrophagen	1:400
Gr1	Granulozyten	1:400
MHC I	Antigen-präsentierende Moleküle auf allen kernhaltigen Zellen	1:800
MHC II	Vor allem auf Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen	1:800
NK 1.1	Natürliche Killerzellen (NK)	1:800
Ter119	Erythrozyten und Erythrozytenvorläuferzellen	1:800

3.8.2 Intrazelluläre Färbungen

3.8.2.1 Intrazelluläre Granzymfärbung

Die Oberflächenfärbung der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 3.8.1 beschrieben bis zum letzten Waschschrift. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 200 µl/ Vertiefung Foxp3 Fix/Perm Puffer aufgenommen und über Nacht im Dunkeln bei 4 °C fixiert und permeabilisiert. Am nächsten Morgen wurde die Platte für 5 min bei 4 °C mit 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit Foxp3 Permeabilisierungspuffer gewaschen. Die Zellen wurden in 20 µl Perm Puffer mit CD16/CD32 Antikörper, welcher im Verhältnis 1:200 verdünnt wurde, aufgenommen und für 10 - 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, um die unspezifische Bindung der intrazellulären Antikörper zu verhindern. Anschließend wurde 50 µl Foxp3 Permeabilisierungspuffer mit konjugiertem intrazellulärem Antikörper in der Verdünnung 1:200 hinzugegeben und für weitere 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit Foxp3 Permeabilisierungspuffer und einmal mit FACS-Puffer gewaschen und im gewünschten Messvolumen aufgenommen. Die durchflusszytometrische Analyse der Proben in der Platte erfolgte direkt im Anschluss.

3.8.2.2 Intrazelluläre Foxp3-Färbung

Die Oberflächenfärbung der Zellen erfolgte bis zum letzten Waschschrift wie in Abschnitt 3.8.1 beschrieben. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 100 µl/Vertiefung Foxp3 Fix/Perm Puffer aufgenommen und für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Anschließend wurde die Platte einmal mit Foxp3 Permeabilisierungspuffer gewaschen. Die Zellen wurden in 20 µl Foxp3 Permeabilisierungspuffer mit CD16/CD32 Antikörper, welcher im Verhältnis 1:200 verdünnt wurde, aufgenommen und für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, um die unspezifische Bindung der intrazellulären Antikörper zu verhindern. Anschließend wurde 50 µl Foxp3 Permeabilisierungspuffer Puffer mit konjugiertem intrazellulärem Antikörper in der Verdünnung 1:200 hinzugegeben und für weitere 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit Permeabilisierungspuffer und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und im gewünschten Messvolumen aufgenommen. Die durchflusszytometrische Analyse der Proben in der Platte erfolgte direkt im Anschluss.

Tabelle 3.3: Eingesetzte intrazelluläre Antikörper, deren Zielzellen und Verdünnung

Antikörper	Markierte Zellpopulation	Verdünnung
Granzym B	Serinprotease mit lytischer Aktivität, die von CTLs und NK-Zellen ausgeschüttet werden kann	1:200
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3 (Foxp3) ist ein essentieller Transkriptionsfaktor und damit ein spezifischer intrazellulärer Marker für regulatorische T-Zellen	1:200

3.8.3 Apoptosemessung

Phosphatidylserine sind ein intrazellulärer Bestandteil der Zellmembran, welche während der frühen Phase der Apoptose an die Außenseite der Zellmembran translozieren. Annexin V bindet Kalzium-abhängig Phosphatidylserine und wird als fluoreszenzmarkierter Farbstoff zur Markierung apoptotischer Zellen benutzt. Da es mit Annexin V nicht möglich ist, zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen zu unterscheiden, wird diese Färbung immer in Kombination mit Propidiumiodid durchgeführt, welches nur in Zellen mit beschädigter Zellmembran eindringen kann. Propidiumiodid positive und Annexin V positive Zellen werden als nekrotisch bezeichnet, Annexin V positive und Propidiumiodid negative Zellen als apoptotisch. Lebende, vitale Zellen sind für beide Marker negativ.

Nach der Oberflächenfärbung wurden die Zellen etwa 15 min vor der Messung in 200 µl Annexin V Bindungspuffer, welcher Kalzium enthält, mit 2 µl/ml Annexin V und 0,5 µl Propidiumiodid pro Probe resuspendiert und anschließend direkt gemessen.

3.8.4 Ausschluss toter Zellen in der Durchflusszytometrie

Zum Ausschluss toter Zellen und Zelltrümmer im Durchflusszytometer wurde der von sich aus fluoreszierende DNA-Farbstoff Propidiumiodid verwendet, welcher selektiv einen

Komplex mit GC-Regionen bildet. Bei intakten Zellen verhindert die unbeschädigte Zellmembran die schnelle Permeation von Propidiumiodid. Bei nekrotischen und bei dem Messvorgang oder der Färbung beschädigten oder getöteten Zellen verliert die Zellmembran ihre Funktion als Schutzbarriere und Propidiumiodid kann ungehindert in die Zelle hineindiffundieren. Vom Zytoplasma aus gelangt der Farbstoff schließlich in den Zellkern und interkaliert dort in die DNA. Propidiumiodid-positive Zellen werden somit als tot markiert und können vom Durchflussmeter erfasst und von der späteren Analyse ausgeschlossen werden. Diese Art der Markierung kann nicht bei fixierten Zellen angewendet werden, da diese zur Gänze positiv für Propidiumiodid wären.

Zum Ausschluss von Zellen, die bereits vor dem Fixieren tot waren, müssen Farbstoffe verwendet werden, welche dauerhaft an die toten Zellen gebunden sind und nicht im Puffer verbleiben müssen. So kann der Farbstoff FVD (engl.: *fixable viability dye*) für die Markierung toter Zellen vor anschließender Fixierung genutzt werden, die Färbung erfolgt gleichzeitig mit den Oberflächenmarkern.

3.9 Proteinisolierung

3.9.1 Gesamtzelllysate

In 6-Well-Zellkulturplatten ausdifferenzierte BmDCs wurden auf Eis gestellt und das komplette Medium verworfen. Nach Zugabe von 65 µl Lysepuffer wurden die Zellen mit Zellschabern vom Boden der Zellkulturplatten gelöst. Die Zellsuspension wurde in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und für 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Suspension für 5 min bei 4 °C mit 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Jeweils 5 µl des Proteinlysats wurden zur Bestimmung der Proteinkonzentration eingesetzt.

3.9.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al. 1951) beruht auf der Biuretreaktion. In dieser bilden die im alkalischen Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenz (Folin-Reagenz) vorhandenen Cu^{2+} -Ionen mit den Peptidbindungen der Proteine einen farbigen Komplex, dabei kann die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ erfolgen. Das einwertige Kupfer reduziert zusammen mit aromatischen Aminosäure-Resten, wie Tyrosin und Tryptophan, die im Folin-Reagenz ebenfalls vorhandenen Heteropolyphosphormolybdate und -wolframate, was in einen Farbumschlag von gelb nach blau resultiert. Dieser Farbumschlag kann zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt werden. Dafür wurden Standards mit bekannter Proteinkonzentration (25, 10, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,25 und 0,1 mg/ml BSA) und die Proben mit Aqua dest. 1:10 verdünnt und je 20 µl in Doppelbestimmung auf eine Platte mit 96 Vertiefungen pipettiert. Zu jeder vorgelegten Probe wurden 10 µl Reagenz A und 80 µl Reagenz B (Bio-Rad) hinzugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation wurde die Extinktion mit einem ELISA-Reader bei 700 nm erfasst.

3.10 Western Blot

Mit der Western Blot oder Protein-Immunoblot Methode ist es möglich, Proteine im Wesentlichen anhand ihrer Größe aufzutrennen und mittels spezifischer Antikörper zu detektieren. Die Proteinproben werden unter Hitzeeinwirkung in einem SDS-Puffer denaturiert. Das Negativ-geladene SDS unterbricht dabei die nicht-kovalenten Bindungen der Proteine und bindet an diese. Damit wird die erneute Ausbildung von Quartär- und Tertiärstrukturen verhindert. Nach der Denaturierung werden die Proteinproben auf ein SDS-Gel geladen, in welchem die Proteine im elektrischen Feld abhängig von ihrer Größe aufgetrennt werden.

Anschließend werden die Proteinbanden mittels eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulose Membran übertragen. In diesem als "Blotten" bezeichneten Transfervorgang wandern die Proteine aus dem Gel in Richtung Anode und bleiben auf der Membranoberfläche haften. Bei diesem Schritt wird das SDS ausgewaschen, dies ermöglicht eine Renaturierung der Proteine, so dass diese zum Teil ihre Sekundär- und Tertiärstrukturen wieder annehmen können. Die gesuchten Proteine werden anschließend mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert.

Für die Western Blot Analyse wurden 10%ige Trenngele verwendet und die Proben auf 5%ige Sammelgele aufgetragen. Von den Gesamtzelllysaten wurden 40 - 60 µg Probe in Probenpuffer (4xSDS) aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und bei 120 V für 90 min aufgetrennt. Der Transfer auf die Membranen (Blotten) erfolgte ebenfalls für 90 min bei 110 V.

Die Membranen wurden im Anschluss kurz in Ponceau-Lösung getaucht, um die Effizienz des Proteintransfers zu prüfen, und anschließend mit TBS-T gewaschen. Nach der einstündigen Blockierung der unspezifischen Bindungen mit 5 % Magermilch in TBS-T wurden die Membranen über Nacht mit den primären monoklonalen Antikörpern inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen vor der mindestens einstündigen Inkubation mit dem sekundären Antikörper dreimal 5 min mit TBS-T gewaschen. Vor der Detektion der Proteine mit dem ECL-System wurden die Membranen fünfmal für 5 min mit TBS-T gewaschen.

Tabelle 3.4: Antikörper für Western Blot

Antikörper	Blockierung	Verdünnung 1. AK	Art und Verdünnung 2. AK
HIF-1 α	5 % Magermilch in TBS-T	1:1000	anti-Kaninchen; 1:100000
α -Tubulin	5 % Magermilch in TBS-T	1:1000	anti-Maus; 1:100000
β -Aktin	5 % Magermilch in TBS-T	1:1000	anti-Kaninchen; 1:100000

3.11 RNA Isolierung und cDNA Synthese

Bei der Isolierung der RNA mit der sauren Phenol-Chloroform-Methode, welche nach Chomczynski und Sacchi (1987) erfolgt, beruht die Trennung von DNA, Proteinen und RNA auf der unterschiedlichen Löslichkeit der Substanzen. Wird ein Zellhomogenat mit einem Gemisch aus wässrigen und organischen Lösungsmitteln inkubiert, resultiert daraus eine unterschiedliche Verteilung der Substanzen in den entsprechenden Phasen. Die Proteine befinden sich in der unteren, organischen Phase, während die RNA in der oberen, wässrigen Phase gelöst ist. Die DNA reichert sich durch den geringen pH-Wert der wässrigen Phase im Phasenübergang zwischen den beiden Phasen an.

Das Medium der BmDCs wurde nach dem Versuchsende komplett aus den 6-Well-Zellkulturplatte entfernt und in jede Vertiefung 700 µl 4 M GTC pipettiert. Die Zellen wurden über Nacht bei -20 °C eingefroren und der Inhalt jeder Vertiefung nach dem Auftauen mit 70 ml 2 M Natriumacetat in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt.

Bei den in 96-Well-Flachbodenplatten kultivierten T-Zellen wurde ebenfalls das Medium komplett aus den Vertiefungen entfernt und anschließend in jede Vertiefung 250 µl 4 M GTC pipettiert. Die Zellen wurden bei -20 °C über Nacht eingefroren und nach dem Auftauen wurde der Inhalt von jeweils drei Vertiefungen mit 70 µl 2 M Natriumacetat in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt.

Alle Proben wurden mit 500 µl Phenol und 350 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (24:25:1) versetzt und kräftig durchmischt, bis die Lösung milchig trüb wurde. Nach 30 bis 60-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben erneut durchmischt und für 30 min bei 4 °C mit 13200 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und die Interphase und die untere organische Phase verworfen. Nach der Zugabe von 600 µl Isopropanol wurde die von DNA und Proteinen gereinigte RNA über Nacht bei -20 °C gefällt und am nächsten Tag für 30 min bei 4 °C mit 13200 rpm zentrifugiert. Das RNA Pellet wurde nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes und der anschließenden Trocknung an der Luft in 300 µl 4 M GTC und 500 µl Isopropanol aufgenommen, gut durchmischt, um das Pellet von der Wand des Reaktionsgefäßes abzulösen und erneut über Nacht bei -20 °C aufbewahrt. Durch die Umfällung wurde eine Reinigung der RNA erreicht. Am nächsten Morgen wurden die Proben erneut für 30 min bei 4 °C mit 13200 rpm zentrifugiert und das Pellet nach Verwerfen des Überstandes mit 500 µl 75%igem Ethanol gewaschen. Nach der etwa 60-minütigen Trocknung bei Raumtemperatur wurde die RNA in 10 - 15 µl DEPC-haltigem Wasser aufgenommen und für 10 bis 15 min bei 60°C erhitzt. Die Anwesenheit von DEPC im Wasser führt zur Deaktivierung möglicherweise

vorhandener Ribonukleasen und damit zum Schutz der RNA vor Abbau. Anschließend wurde der RNA-Gehalt der Lösung bei 260 nm Absorption gemessen. Die Reinheit wurde durch die Bildung des Quotienten bei 260/280 überprüft, welcher bei reiner RNA bei einem Verhältnis von 2,0 liegt. Die RNA wurde anschließend bei -20 °C eingefroren.

Für die Herstellung der cDNA wurden von jeder Probe 1 µg RNA eingesetzt und das Volumen mit DEPC-Wasser auf insgesamt 9,5 µl gebracht. Nach Zugabe von 2,5 µl Oligo-dT wurden die Proben für 10 min bei 60 °C erhitzt und nachfolgend 5 min auf Eis gekühlt. Dieser Schritt war notwendig, um die RNA zu denaturieren, die sofortige Abkühlung auf Eis verhinderte die erneute Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Nukleotiden und schonte das temperaturlabile Enzym, das anschließend zugegeben wurde.

Der Mastermix wurde wie in Tabelle 3.5 beschrieben erstellt und zu den Proben hinzugegeben, das Gesamtvolumen der Proben betrug 25 µl. Das Erhitzen der Proben auf 45 °C für 90 min führte zur Anlagerung der Oligo-dTs an die Poly A-Sequenz der mRNA. In den nachfolgenden 30 min bei 52 °C erfolgte die Amplifikation der cDNA, welche abschließend zur Denaturierung für 15 min auf 95 °C erhitzt wurde. Die kurzfristige Lagerung der cDNA erfolgte bei 4 °C, die langfristige Lagerung bei -20 °C.

Tabelle 3.5: Mastermix für cDNA Synthese

13 µl	Mastermix
5,0 µl	5x M-MLV Buffer
5,0 µl	NTPs
2,5 µl	H ₂ O
0,5 µl	MML-V Reverse Transkriptase

3.12 PCR und Echtzeit-PCR

Bei der Polymerase Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) handelt es sich um eine Methode, mittels der es möglich ist, eine anfänglich geringe Menge eines bestimmten Gens, z.B. aus einer cDNA-Bank, exponentiell zu vervielfältigen, um es dadurch nachweisen zu können.

Der Mastermix für die PCR wurde wie in Tabelle 3.6 beschrieben erstellt (24,5 µl pro Probe) und in PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt. Im Anschluss wurden 0,5 µl cDNA zu dem Mix hinzugegeben und die Proben im Thermocycler platziert.

Zu Anfang heizte der Thermocycler für 10 min auf 96 °C, um die in der Probe enthaltene cDNA-Stränge vollständig voneinander zu trennen. Die Zyklen der darauffolgenden Amplifikationsphase, in welcher die cDNA mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide und der DNA-Polymerase vervielfältigt wurde, unterteilten sich in drei Schritte. Der erste Schritt jedes Zyklus war die Denaturierung der DNA-Produkte bei 96 °C. Dieser folgte die Primerhybridisierung, das sogenannte *Annealing*, in der sich die Primer bei einer spezifischen Temperatur, abhängig vom Schmelzpunkt der Primersequenz, an die komplementäre DNA-Sequenz anlagerten. Im letzten Schritt, der Elongationsphase, wurde ausgehend von den Primern die vorhandene DNA komplementär neusynthetisiert. Nach der Amplifikationsphase erfolgte eine abschließende Synthese für 10 min bei 72 °C, zum Auffüllen eventuell verbliebener kurzer Fragmente. Die Zyklenanzahl und die Annealing-Temperatur wurden wie in Tabelle 2.8 angegeben gewählt.

Zur Analyse wurde das fertige Produkt zusammen mit einem Größenstandard auf ein 2%iges Agarosegel mit 0,07 ppm Ethidiumbromid aufgetragen und das PCR-Produkt nach der Gelelektrophorese anhand der Größenstandards unter UV-Licht identifiziert. Die elektronisch gespeicherten Bilder der Gele wurden anschließend mit dem Programm ImageJ analysiert und ausgewertet.

Initialphase	96 °C;	3 min	} 25-31x
Denaturierung	96 °C;	1 min	
Annealing	60 – 62 °C;	1,5 min	
Elongation	72 °C;	3 min	
abschließende Synthese	72 °C;	10 min	

Tabelle 3.6: Mastermix für PCR

24,50 µl	Mastermix
5,00 µl	5x Puffer
2,00 µl	dNTP
0,50 µl	je Primer
17,00 µl	Wasser
0,05 µl	GoTaq

Die Quantifizierung der cDNA erfolgte mittels Echtzeit-PCR (*Real Time PCR*). Die Menge des PCR Produkts wurde während der Amplifikation mit dem fluoreszierenden Farbstoff SYBR Green I, welcher in die doppelsträngige DNA interkaliert, in jedem Zyklus direkt detektiert und graphisch in einer Kurve aufgetragen. Für den Leerwert, bei welchem Aqua

dest. statt cDNA eingesetzt wurde, und die cDNA Proben erfolgte eine Doppelbestimmung, dazu wurde der Mastermix wie in Tabelle 3.7 beschrieben erstellt. In eine Platte mit 96 Vertiefungen wurde zunächst der Leerwert vorgelegt und die verbliebenen Vertiefungen im Anschluss mit den zu untersuchenden Proben beladen. Pro Vertiefung wurden 20 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Aufgrund der hohen Effizienz der Polymerase erfolgten Annealing und Amplifikation bei der Echtzeit-PCR in einem Schritt.

Die Echtzeit-PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Initialphase	95 °C; 10 min	} 1x
Amplifikationsphase	95 °C; 15 s 60 °C; 60 s	} 35-40x

Tabelle 3.7: Mastermix für Echtzeit-PCR

2x Bestimmung Probe	Mastermix (20 µl / Vertiefung)
25 µl	2x MESA Green qPCR MastermixPlus
22 µl	H ₂ O
1 µl	je Primer
1 µl	cDNA
50 µl	Gesamtvolumen

Die Auswertung der Echtzeit-PCR erfolgte mittels der relativen Quantifizierung oder $\Delta\Delta C_t$ Methode (engl. *Cycle Threshold*). Dabei wird die Konzentration der zu untersuchenden Gene nicht anhand einer Standardreihe bestimmt, sondern die Genexpression des zu untersuchenden Zielgens auf ein zweites nicht reguliertes und homogen exprimiertes Referenzgen bezogen (Livak & Schmittgen 2001).

Der $\Delta\Delta C_t$ Wert wird nach folgenden Formeln berechnet:

$$\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ Versuch} - \Delta C_t \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Verhältnis} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Wert gibt die Induktion über der Kontrolle wieder.

3.13 Histologische Methoden

3.13.1 Fixierung und Paraffineinbettung von Organen

Ein Teilstück der entnommenen Milz wurde über Nacht in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Das Entwässern in einer aufsteigenden Alkoholreihe, das Ersetzen des Alkohols durch ein Intermedium und das Paraffinieren erfolgte in einem Automaten des Instituts für Anatomie. Anschließend wurden die Milzstücke in Paraffin eingebettet und mit dem Rotationsmikrotom 5 µm dicke Schnitte hergestellt. Jeweils zwei Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgezogen.

3.13.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Vor der Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) mussten die Schnitte zuerst deparaffiniert und rehydriert werden. Die Deparaffinierung erfolgte für zweimal 10 min in dem Intermedium Xylol. Bei einem Intermedium handelt es sich um ein sowohl alkohol- als auch paraffinverträgliches Lösungsmittel, welches jedoch keinerlei Wasser aufnimmt. Die Rehydrierung erfolgte in absteigender Alkoholreihe beginnend mit Isopropanol, über 90 % Ethanol und 70 % Ethanol, bis hin zu 50 % Ethanol, die Schnitte verblieben jeweils für 5 min in dem jeweiligen Alkohol. Anschließend wurden die Schnitte kurz in vollentsalztes (VE) Wasser getaucht und für 1 min in Hämatoxylin gefärbt. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der in Form des basischen Hämalans seine intensiv färbende Eigenschaft entwickelt, und alle sauren bzw. basischen Strukturen, wie die Zellkerne, blau färbt. Die Schnitte wurden in einer Küvette unter fließendem Leitungswasser gewaschen, bis das Wasser entfärbt und ein pH-Wertwechsel eingetreten war. Danach wurden sie erneut kurz in VE Wasser getaucht und für 40 s in Eosin gefärbt. Bei Eosin handelt es sich um einen synthetischen Farbstoff, welcher alle Zellstrukturen, welche basisch oder azidophil sind, rot anfärbt. Zu diesen Strukturen gehören vor allem Zytoplasmaproteine, Mitochondrien, das glatte endoplasmatische Retikulum und Kollagen. Nach der Färbung wurden die Schnitte kurz in VE Wasser, dann in 50 % und 70 % Ethanol getaucht und mit 90 % Ethanol, gefolgt von Isopropanol und zweimal Xylol für jeweils 5 min dehydriert. Abschließend wurden die Schnitte mit dem Eindeckmedium Cytoseal eingedeckelt, getrocknet und mikroskopiert.

4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil wurde in sechs Abschnitte gegliedert. Nach dem Aufzeigen der Knock-out-Effizienz in den dendritischen Zellen erfolgt zunächst die Darstellung von Viruslast in der Milz und der Milzmorphologie von HIF-1 α ^{+f/+f} Kontroll- und CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Knock-out-Mäusen im Verlauf von akuter und chronischer Virusinfektion. Nach der Analyse der durchflusszytometrisch erfassten, virusinduzierten Veränderungen der Immunzellpopulationen, wurde zudem die Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen aus naiven und virusinfizierten Tieren mittels eines *in vitro* Proliferations- und Aktivierungsassays näher bestimmt. Im fünften Abschnitt wird die HIF-1 α Proteinexpression und die Induktion der mRNA-Expression verschiedener Gene in aus dem Knochenmark generierten dendritischen Zellen (engl.: *bone marrow-derived dendritic cells*, BmDC) nach akuter und chronischer Virusinfektion dargestellt. Der letzte Teil befasst sich mit dem Einfluss der FV Infektion in chronisch infizierten CD4Cre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen, um Ähnlichkeiten im Verlauf der Virusinfektion zwischen den Mausstämmen aufzuzeigen.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse, die Signifikanz der einzelnen Gruppen wurde mit dem Bonferroni-Test als Post-hoc-Test ermittelt. Das Signifikanzniveau der Knock-out-Effizienz wurde mittels eines t-Test mit Welch Korrektur bestimmt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

4.1 Knock-out-Effizienz in BmDCs aus CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen

Zur Bestimmung der Knock-out-Effizienz der CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse, welche einen konditionellen HIF-1 α Knock-out in den CD11c⁺ dendritischen Zellen aufweisen, wurde die Expression des Exon 2 von HIF-1 α bestimmt. Dafür wurde die mRNA aus dendritischen Zellen, welche aus dem Knochenmark generiert wurden, eingesetzt. Für die Analyse wurden die Proben aller Versuchstiere verwendet.

Die Expression des HIF-1 α Exon 2 war in den BmDCs aus den CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen im Vergleich zu der Expression in den dendritischen Zellen aus den HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen um 75 % reduziert. Die CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse zeigen damit einen signifikanten, wenngleich nicht vollständigen Knock-out auf (s. Abb. 4.1).

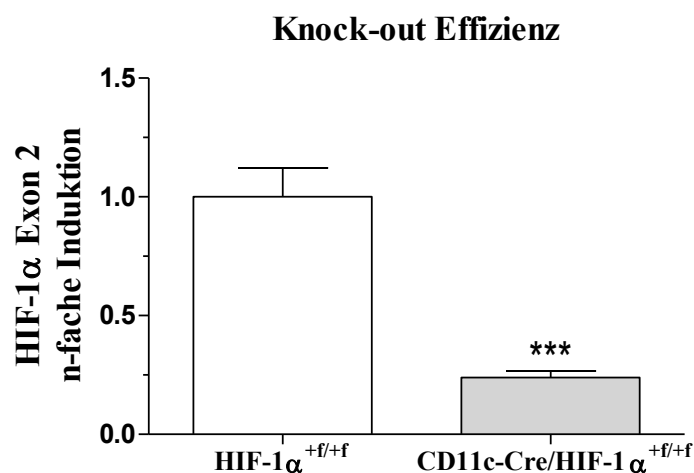


Abb. 4.1: Signifikante Knock-out-Effizienz in BmDCs aus CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen

Die Analyse der Knock-out-Effizienz in dendritischen Zellen aus dem Knochenmark aller Versuchstiere erfolgte mittels Echtzeit-PCR. Alle Werte wurden auf den Mittelwert der HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse als Kontrolle bezogen. Die Expression des HIF-1 α Exon 2 war in den dendritischen Zellen aus CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen im Vergleich zu den dendritischen Zellen aus HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen um mehr als 75 % signifikant reduziert (Mittelwerte \pm SEM; n=32).

4.2 Einfluss akuter und chronischer FV Infektion auf Viruslast und Milzstruktur in HIF-1 $\alpha^{+/+}$ und CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen

4.2.1 Chronische FV Infektion resultiert in einigen HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen in massiver Splenomegalie und erhöhter Anzahl von Erythrozyten

Von den naiven Mäusen und mit FV-infizierten Mäusen wurden 5 und 11 Tage *post infectionem* (Tpi) sowie 12 Wochen *post infectionem* (Wpi) die Milzen entnommen und direkt nach der Organentnahme gewogen. Bei der chronischen Infektion wurde dabei zwischen Tieren mit niedriger Viruslast und normalen Milzen (12 Wpi) sowie hoher Viruslast und Splenomegalie (12 Wpi^{hoch}) unterschieden. Anschließend wurde durch Markierung mit dem Oberflächenmarker Ter119 der Anteil an Erythrozyten und Erythrozytenvorläuferzellen in den Milzen durchflusszytometrisch für die verschiedenen Infektionszeitpunkte bestimmt.

Im Verlauf der akuten FV Infektion verdreifachte sich das Milzgewicht im Vergleich zum Ausgangsgewicht. So stieg das Milzgewicht von durchschnittlich 0,075 g in naiven Mäusen auf 0,150 g an Tag 5 und 0,225 g an Tag 11 (s. Abb. 4.2). Während der akuten Phase der Infektion konnten jedoch keine Unterschiede zwischen HIF-1 $\alpha^{+/+}$ und CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen detektiert werden. Erst im Verlauf der chronischen Infektion konnten Unterschiede zwischen Kontroll- und Knock-out-Mäusen aufgezeigt werden. Während sich bei allen CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ und der Hälfte der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse das Milzgewicht mit 0,1 g annähernd normalisierte, entwickelte die andere Hälfte der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse eine massive Splenomegalie mit einem Milzgewicht von durchschnittlich 0,476 g (s. Abb. 4.2).

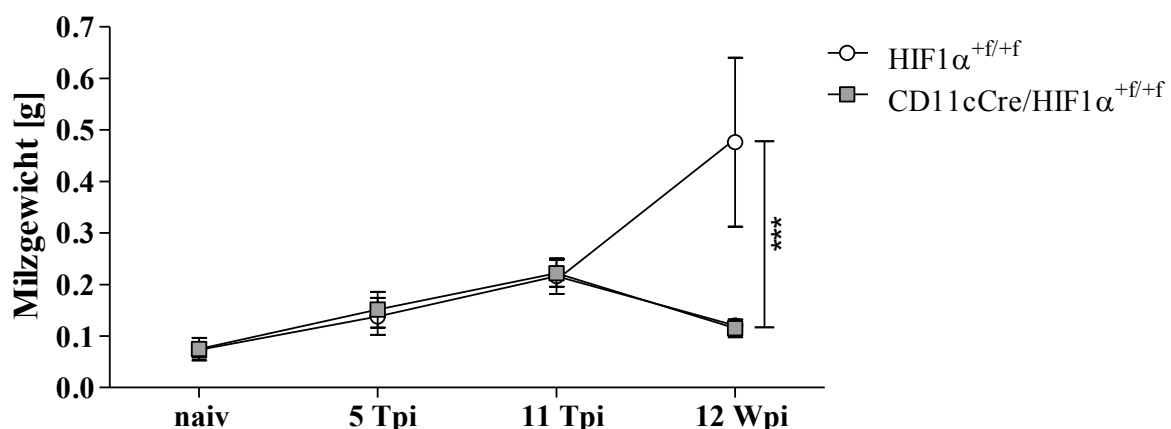


Abb. 4.2: Chronische FV Infektion resultiert in erhöhter Splenomegalie bei einem Teil der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse

Das Milzgewicht von naiven und FV-infizierten HIF-1 $\alpha^{+/+}$ und CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ wurde direkt nach der Organentnahme bestimmt. In der akuten Phase der Infektion verdreifachte sich das Milzgewicht, jedoch konnten keine Unterschiede zwischen HIF-1 $\alpha^{+/+}$ und CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen detektiert werden. Während der chronischen Infektion 12 Wochen *post infectionem* (Wpi) war das Milzgewicht bei der Hälfte der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse so stark erhöht, dass sich die Gesamtgruppen signifikant voneinander unterscheiden (Mittelwerte \pm SD; naiv n=15, 5 Tage *post infectionem* (Tpi) n=8, 11 Tpi n=9, HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi n=9, 12 Wpi^{hoch} n=7, CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi n=15).

Nach der chronischen FV Infektion waren die Milzen aller CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse und der Hälfte der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse in Größe und Form vergleichbar. Bei der anderen Hälfte der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Tiere konnte eine massive Splenomegalie beobachtet werden. Die Milzen waren etwa zwei- bis dreimal so breit und etwa doppelt so lang die Milzen der naiven Tiere (s. Abb. 4.3).

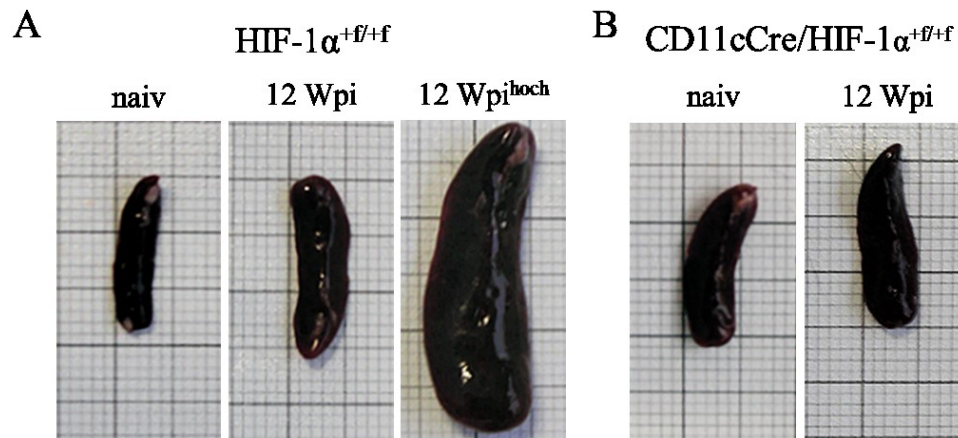


Abb. 4.3: Stark vergrößerte Milz bei HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Tieren nach chronischer Virusinfektion

Die Milzen wurden direkt nach der Organentnahme auf Millimeterpapier fotografiert, ein Kleinstquadrat entspricht einem Millimeter. Die chronische FV Infektion führte zu einer deutlichen Splenomegalie in einigen der infizierten HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Tiere, während die Milzen der anderen infizierten Mäuse mit denen der naiven Tiere vergleichbar waren (gezeigt ist jeweils eine repräsentative Milz für den Zeitpunkt 12 Wochen aus naiv n=15, HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi n=9, 12 Wpi^{hoch} n=7, CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ n=15).

Die Zahl der im Durchflusszytometer gemessenen Ter119-positiven (Ter119⁺) Erythrozyten und Erythrozytenvorläuferzellen verhielt sich proportional zum Milzgewicht. Die Zahl der Ter119⁺ Zellen nahm in der akuten Phase der Infektion zu und normalisierte sich außer in den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen mit einer hohen Viruslast nach chronischer FV Infektion. Die Anzahl der Ter119⁺ Zellen verdoppelte sich im Vergleich zu den naiven Tieren an Tag 5 bei den CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen von 12,2 % auf 27,5 %, während sich diese in den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen von 13,5 % auf 35,4 % annähernd verdreifachte (s. Abb. 4.4). Nach 11 Tagen Infektion blieb die Erythrozytenzahl in den CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen konstant, in den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen konnte jedoch eine Abnahme der Anzahl an Ter119⁺ Zellen von Tag 5 zu Tag 11 um 10 % beobachtet werden. 12 Wochen nach der Infektion unterschied sich die Zahl der Ter119⁺ Zellen in allen Tieren mit geringer Viruslast nicht von den naiven Mäusen, während der Anteil an Ter119⁺ Zellen in den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen mit massiver Splenomegalie signifikant auf 55,3 % anstieg (s. Abb. 4.4).

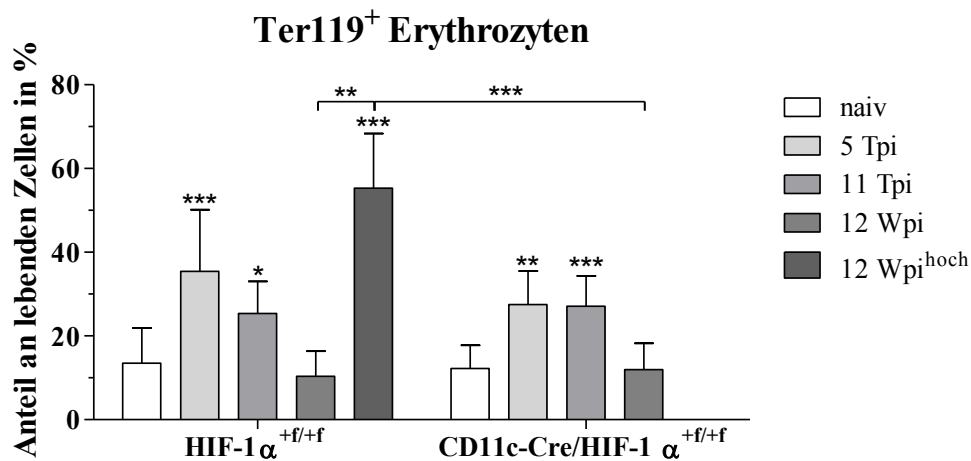


Abb. 4.4: Signifikant erhöhte Anzahl von Ter119⁺ Erythrozyten in den Milzen einiger der chronisch infizierten HIF-1α^{+/+/+} Mäuse

Der Anteil an Ter119⁺ Erythrozyten und Erythrozytenvorläuferzellen in der Milz wurde für jeden untersuchten Infektionszeitpunkt durchflusszytometrisch bestimmt. Die Anzahl der Ter119⁺ Erythrozyten nahm im Verlauf der akuten Infektion in allen Mäusen zu und normalisierte sich in der chronischen Phase. In den HIF-1α^{+/+/+} Mäusen mit massiver Splenomegalie 12 Wpi^{hoch} stieg die Zahl der Ter119⁺ Zellen signifikant an (Mittelwerte ± SD; naiv n=15, 5 Tpi n=8, 11 Tpi n=9, HIF-1α^{+/+/+} 12 Wpi n=9, 12 Wpi^{hoch} n=7, CD11cCre/HIF-1α^{+/+/+} n=15).

4.2.2 Chronische FV Infektion kann zu einer rezidivierenden Viruslast in der Milz und zu erhöhter FV mRNA in BmDCs von HIF-1α^{+/+/+} Mäusen führen

Von den naiven sowie akut und chronisch infizierten Mäusen wurden die Milzen und das Knochenmark entnommen. Bei der chronischen Infektion wurde dabei zwischen Tieren mit niedriger Viruslast (12 Wpi) und hoher Viruslast (12 Wpi^{hoch}) unterschieden. Mittels einer definierten Anzahl eingesetzter Milzzellen aus den infizierten Tieren wurden für jeden Infektionszeitpunkt die Zahl der infizierten Zellen in der Milz mittels IC-Assay bestimmt. Das Knochenmark von naiven und infizierten Mäusen wurde verwendet, um dendritische Zellen (BmDCs) zu generieren und aus der isolierten RNA die Induktion der FV mRNA zu quantifizieren.

Sowohl in den HIF-1α^{+/+/+} als auch den CD11cCre/HIF-1α^{+/+/+} Mäusen war die Viruslast 5 Tpi stark erhöht und nahm im Verlauf von akuter zu chronischer Infektion beständig ab. Auffallend war die rezidivierende Infektion 12 Wochen nach Infektion in der Hälfte der HIF-1α^{+/+/+} Tiere. An Tag 5 nach Infektion war die Zahl der infizierten Zellen in der Milz in den CD11cCre/HIF-1α^{+/+/+} Mäusen mit 4052 infizierten Zellen pro Millionen Zellen gegenüber den HIF-1α^{+/+/+} Mäusen mit 1727 infizierten Zellen pro Millionen Zellen signifikant erhöht. An Tag 11 lag die Viruslast sowohl bei den CD11cCre/HIF-1α^{+/+/+} als auch den HIF-1α^{+/+/+} Mäusen bei nur noch 75 infizierten Zellen pro Millionen Zellen und war gegenüber dem vorherigen Zeitpunkt jeweils signifikant reduziert. Die abnehmende Viruslast

war fortschreitend und 12 Wochen nach Infektion konnten bei den CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 6 bis 7 infizierte Zellen pro Millionen und der Hälfte der chronisch infizierten HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen 3 infizierte Zellen pro Millionen Zellen nachgewiesen werden. In den anderen HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Tieren stieg die Zahl der infizierten Zellen pro Millionen Zellen auf 739 an und war damit gegenüber den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen mit geringer Viruslast um beinahe das 250fache erhöht. Aufgrund der Varianzinhomogenität der Gruppen und der Korrektur des Signifikanzniveaus α nach Bonferroni als Post-hoc-Test ist diese Zunahme mit einem p-Wert von 0,18 nicht signifikant (s. Abb. 4.5).

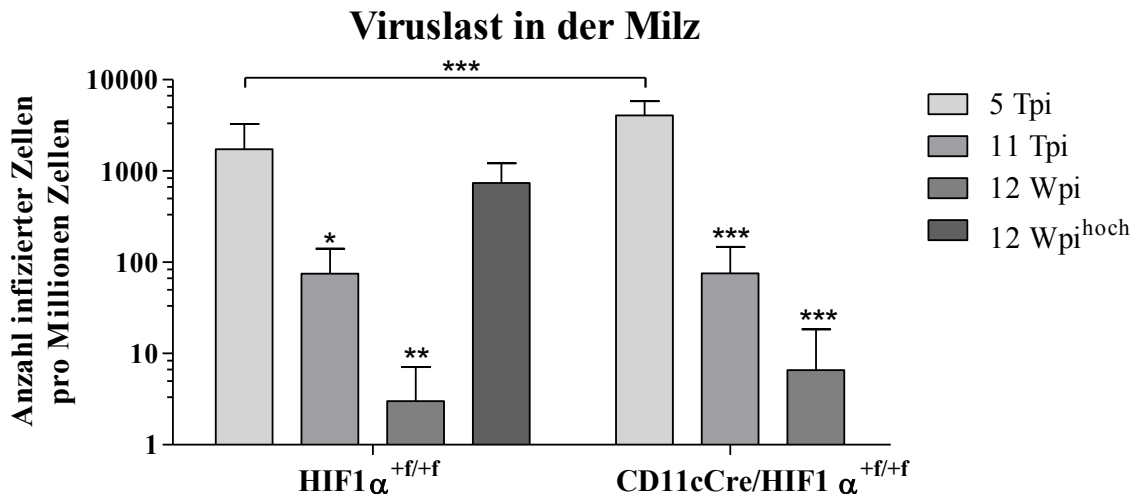


Abb. 4.5: Höchste Viruslast 5 Tpi mit erneutem Anstieg in einigen chronisch infizierten HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen

Für jeden Infektionszeitpunkt wurde ein IC-Assay mit den Milzzellen FV-infizierter Mäuse durchgeführt. Die maximale Viruslast 5 Tpi war bei den CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Tieren im Vergleich zu den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Tieren signifikant erhöht. Im Verlauf von akuter und chronischer Infektion nahm die Viruslast beständig ab, stieg bei der Hälfte der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse 12 Wpi jedoch erneut an (Mittelwerte \pm SD; 5 Tpi n=8, 11 Tpi n=6, HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi n=9, HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi^{hoch} n=7, CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi n=15).

Die Induktion der FV mRNA in den dendritischen Zellen aus dem Knochenmark infizierter Mäuse verhält sich proportional zur Viruslast in der Milz. Die maximale Induktion der FV env mRNA an Tag 5 nach Infektion war gegenüber der mRNA Expression in den naiven Tieren signifikant erhöht und nahm im Verlauf der akuten und chronischen Infektion beständig ab. 12 Wochen nach Infektion wurden nur noch geringe Mengen an FV mRNA nachgewiesen. Jedoch konnte in den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse mit einer erhöhten Viruslast 12 Wpi zugleich eine deutlich erhöhte Induktion der FV env mRNA gemessen werden. Die FV mRNA Expression in den Tieren mit geringer Viruslast war gegenüber den nichtinfizierten Kontrollen nur geringfügig erhöht. Im Gegensatz zur Viruslast war die FV mRNA Expression mit 3543-fachen Induktion in den CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen im Vergleich zu 4369-fachen Induktion in den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen 5 Tpi um etwa ein Viertel geringer. Auch zu den

anderen Zeitpunkten der Infektion war die FV mRNA Expression in den BmDCs aus CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen gegenüber der Expression in den BmDCs der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen reduziert (s. Abb. 4.6).

Virus mRNA in BmDCs

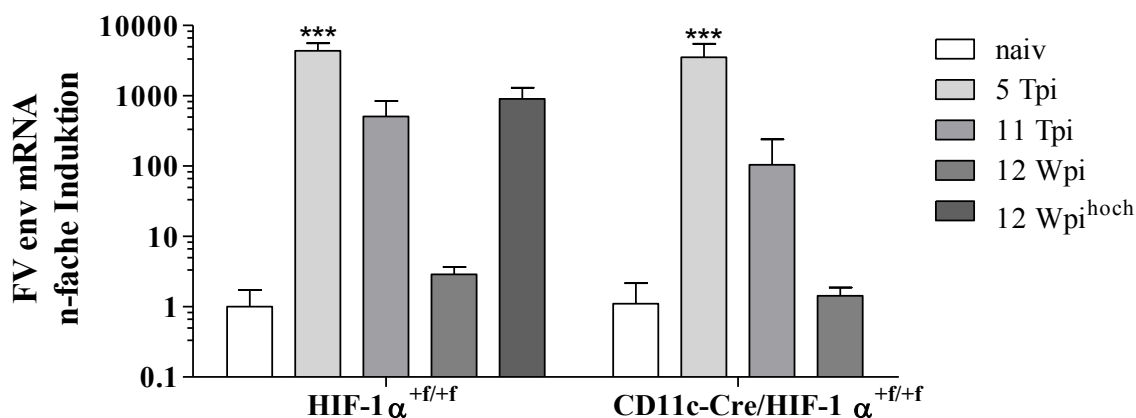


Abb. 4.6: Rezidivierende Induktion der FV Virus mRNA in den dendritischen Zellen chronisch infizierter HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse

Die Analyse der Genexpression in dendritischen Zellen aus dem Knochenmark naiver und FV-infizierter Mäuse erfolgte mittels Echtzeit-PCR. Alle Werte wurden auf den Mittelwert der naiven HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Tiere als Kontrolle bezogen. Die maximale Induktion von FV env mRNA 5 Tpi nahm im Verlauf der akuten und chronischen Infektion beständig ab. Ein erneuter deutlicher Anstieg der FV env mRNA Induktion konnte 12 Wpi^{hoch} in den BmDCs der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen nachgewiesen werden (Mittelwerte \pm SD; naiv n=10, 5 Tpi n=8, 11 Tpi n=6, HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi n=7, HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi^{hoch} n=5, CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi n=9).

4.2.3 Akute und chronische FV Infektion führen zu strukturellen Veränderungen der Milzhistologie in HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen

Sowohl die akute als auch die chronische FV Infektion kann in den infizierten Mäusen zu einem erhöhten Milzgewicht führen, welches mit Veränderungen der Milzstruktur einhergehen könnte. Um eventuelle Veränderungen der Milzstruktur nachzuweisen, wurden Paraffinschnitte von den Milzen naiver und FV-infizierter Mäuse mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt und durchlichtmikroskopisch untersucht.

Die Milzschnitte der naiven HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse zeigten eine scharfe Abgrenzung von roter und weißer Milzpulpa. Die gesunden Milzen bestanden zu etwa 70 % aus der roten Pulpa, welche vor allem Erythrozyten, Blutplättchen und Zellen des angeborenen Immunsystems enthält. In den Lymphfollikeln der weißen Pulpa befinden sich vornehmlich die B- bzw. auch die T-Lymphozyten des angeborenen Immunsystems. Zwischen roter und weißer Pulpa ist zudem schwach die Marginalzone zu erkennen, wo vor allem Makrophagen zu finden sind (Junqueira & Carneiro 2004). Bereits 5 Tage nach der FV Infektion wurden histologische Unterschiede in der Milzstruktur der HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse nachgewiesen. Zwar konnte auch hier eine klare Unterscheidung zwischen roter und weißer Pulpa getroffen werden, jedoch kam es zu einem deutlichen Verlust der Lymphfollikel und damit der Milzstruktur. Auch nach 11 Tagen war diese Veränderung der Milzstruktur sichtbar, wenngleich auch hier noch klar abgegrenzte Lymphfollikel erfasst werden konnten. In der chronischen Phase der Infektion konnten eindeutige Unterschiede zwischen den HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen mit niedriger und mit hoher Viruslast festgestellt werden. Während die Milzstruktur der Tiere mit geringer Viruslast vergleichbar mit der Milzstruktur naiver Mäuse war, führte die massive Splenomegalie in den Tieren mit hoher Viruslast zu einem fast vollständigen Verlust der Milzstruktur. Von fünf ausgewerteten Milzen konnten nur in einem Schnitt überhaupt Lymphfollikel identifiziert werden; es handelte sich hierbei um sehr wenige, kleine Lymphfollikel (s. Abb. 4.7).

Die Milzstruktur der naiven CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse glich der Struktur der naiven HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse. In den mit H&E gefärbten Milzschnitten konnten rote und weiße Milzpulpa eindeutig voneinander abgegrenzt werden. Die FV Infektion der CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse führte zwar, wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, in den akut infizierten Tieren zu einer leichten Splenomegalie, jedoch blieb die Milzstruktur erhalten und es konnten keine strukturellen Veränderungen nachgewiesen werden. Auch 12 Wochen nach Infektion konnten in den Milzschnitten der infizierten Tiere keine Unterschiede zu den Schnitten naiver CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse detektiert werden (s. Abb. 4.8).

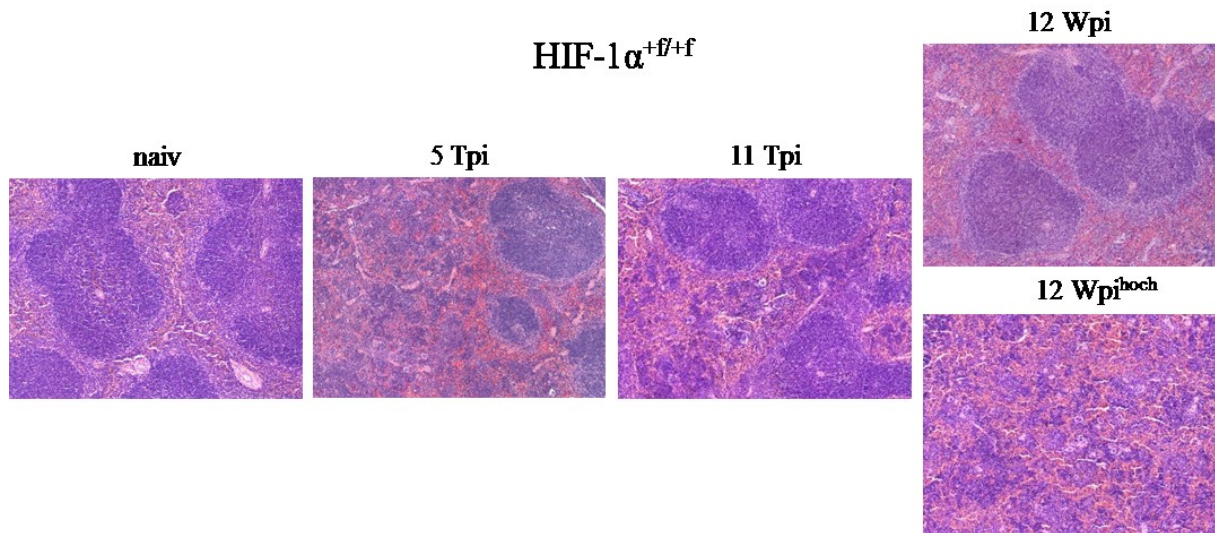


Abb. 4.7: Fortschreitender Verlust der Milzstruktur in FV-infizierten $HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen

Durchlichtmikroskopische Aufnahmen mit H&E gefärbter Milzschnitte naiver und FV-infizierter $HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäuse. Die FV Infektion führte in ihrem Verlauf von akuter zu chronischer Infektion zu einem fortschreitenden Verlust der Lymphfollikel und damit der Struktur der Milz in Tieren mit erhöhter Viruslast (10x Vergrößerung; gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Bildausschnitt aus naiv n=10, 5 Tpi n=8, 11 Tpi n=8, 12 Wpi und 12 Wpi^{hoch} n=5).

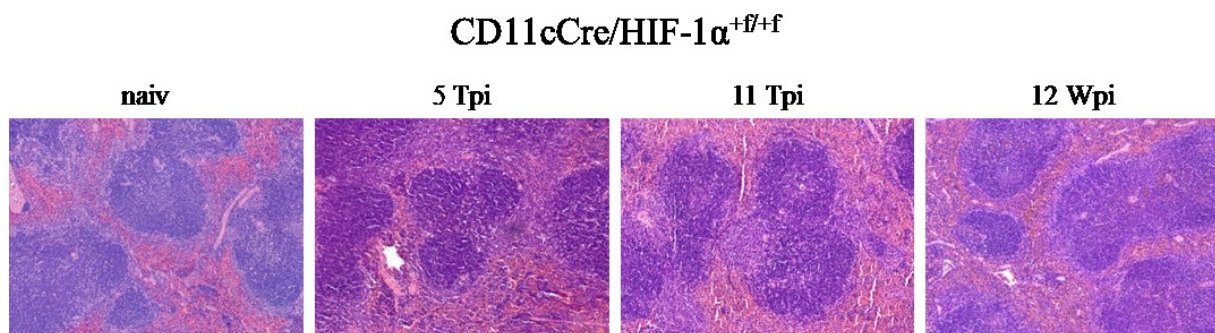


Abb. 4.8: Keine Veränderung der Milzstruktur in FV-infizierten $CD11cCre/HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäuse

Durchlichtmikroskopische Aufnahmen mit H&E gefärbter Milzschnitte naiver und FV-infizierter $CD11cCre/HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäuse. Weder akute noch chronische FV Infektion führte zu einer Veränderung der Milzstruktur infizierter Knock-out-Mäuse (10x Vergrößerung; gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Bildausschnitt aus naiv n=10, 5 Tpi n=8, 11 Tpi n=8, 12Wpi n=10).

Um den Verlust der Lymphfollikel der Milz besser nachverfolgen zu können, wurde der Quotient aus der Fläche der Lymphfollikel und der Gesamtfläche des Milzschnittes gebildet. So konnte der Anteil an Lymphfollikeln in der Milz im Verlauf der FV Infektion bestimmt werden.

In naiven $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ und $\text{CD11cCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ Mäusen betrug der Anteil an Lymphfollikeln etwa 27 % der Milzfläche. Während sich der Anteil an Lymphfollikeln in den Milzen der $\text{CD11cCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ Tiere in der akuten Phase der Infektion nicht veränderte, sank dieser in den 5 und 11 Tage infizierten $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ Mäusen auf etwa 12 % der Milzfläche. In der chronischen Phase der Infektion stieg der Anteil an Lymphfollikeln in den $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ Mäusen mit niedriger Viruslast auf 39,1 % und $\text{CD11cCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ Mäusen auf 37,5 % der Milzfläche an. In den $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ Mäusen mit hoher Viruslast kam es zu einem fast vollständigen Verlust der Lymphfollikel, deren Anteil an der Gesamtfläche der Milz war auf 0,5 % gesunken (s. Abb. 4.9).

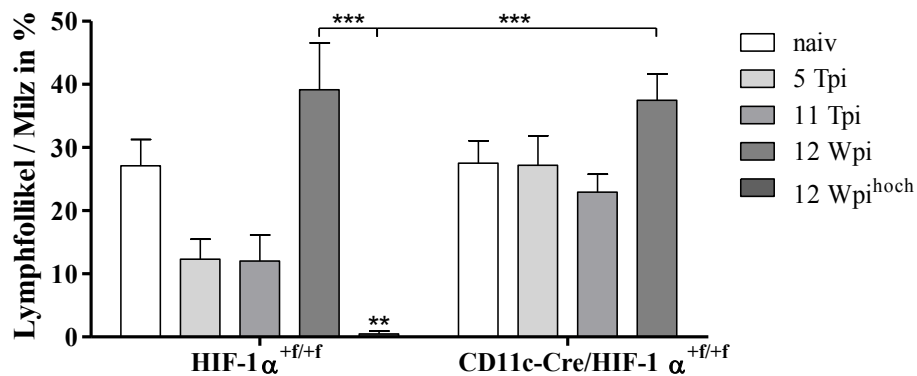


Abb. 4.9: Fortschreitender Verlust der Lymphfollikel der Milz bei infizierten $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ Mäusen

Um den Anteil an Lymphfollikeln der Milz zu bestimmen, wurde der Quotient aus der Fläche der Lymphfollikel und der Gesamtfläche des mit H&E gefärbten Milzschnittes gebildet. In den FV-infizierten $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ Mäusen nahm der Verlust der Lymphfollikel im Verlauf der Infektion zu, während die FV Infektion von $\text{CD11cCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ Mäusen zu keinem Verlust der Lymphfollikel führte (Mittelwerte \pm SD; naiv n=10, 5 Tpi n=8, 11 Tpi n=8, $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ 12 Wpi und 12 Wpi^{hoch} n=5, $\text{CD11cCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ 12Wpi n=10).

4.3 Verteilung der Immunzellpopulationen in der Milz nach FV Infektion

Um die Verteilung der unterschiedlichen Zellpopulationen in der Milz nach FV Infektion untersuchen zu können, wurden die Zellen mit verschiedenen spezifischen Antikörpern markiert. Durch die individuelle Kombination von Oberflächen- und intrazellulären Antikörpern konnten einzelne Zellpopulationen sowie deren Aktivierungsstatus für jeden Infektionszeitpunkt durchflusszytometrisch gemessen und analysiert werden. In die Analyse wurden nur die lebenden Zellen einbezogen, welche negativ für einen der beiden Lebend-Tod-Farbstoffe Propidiumiodid oder FVD waren.

4.3.1 Erhöhte Anzahl antigenpräsentierender Zellen und Granulozyten in der Milz von HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen nach chronischer FV Infektion

Zur Charakterisierung der Zellen des angeborenen Immunsystems im Verlauf von akuter und chronischer FV Infektion wurden verschiedene Oberflächenmarker eingesetzt. Für die Identifikation von Makrophagen wurde der spezifische Antikörper F4/80 verwendet, während dendritische Zellen mit dem Oberflächenmarker CD11c identifiziert wurden. Als dendritische Zellen wurden ausschließlich die CD11c⁺ Zellen mit einer hohen Fluoreszenzintensität charakterisiert, da diese für den Makrophagenmarker F4/80 negativ sind. Die Gesamtheit der antigenpräsentierenden, myeloischen Zellen, zu welchen ebenfalls Makrophagen und dendritische Zellen gehören, wurde mit CD11b als Oberflächenmarker erfasst.

Die Zahl der CD11c⁺ dendritischen Zellen stieg im Verlauf der akuten FV Infektion sowohl in den HIF-1 α ^{+f/+f} als auch den CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen von 1,2 % der lebenden Zellen in den naiven Tieren um etwa ein Drittel an Tag 5 und Tag 11 nach Infektion an. Während der Anteil an CD11c⁺ Zellen nach 12 Wochen in den Mäusen mit geringer Viruslast dem der naiven Tiere entsprach, erreichte deren Anzahl in den HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen mit hoher Viruslast ihr Maximum von 6,4 % (s. Abb. 4.10, A). Auch die Zahl der F4/80⁺ Makrophagen stieg im Verlauf der akuten FV Infektion von 1,2 % der lebenden Zellen in den naiven Tieren auf mehr als das Doppelte an Tag 5 auf 3,5 % an. Das Maximum wurde an Tag 11 nach Infektion mit einem Makrophagenanteil von 6,0 % der lebenden Zellen erreicht. Die Anzahl der F4/80⁺ Makrophagen in den Milzen der CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse entsprach der der HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse. In der chronischen Phase der Infektion normalisierte sich die Zahl der Makrophagen in den Tieren mit geringer Viruslast, während deren Anzahl mit 5,5 % der lebenden Zellen in den HIF-1 α ^{+f/+f} Tieren mit hoher Viruslast naiven HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen und 12 Wochen infizierten CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen signifikant erhöht war (s. Abb. 4.10, B). Der Anteil an CD11b⁺ myeloischen Zellen veränderte sich im Verlauf der akuten FV Infektion nur unwesentlich und nahm nach chronischer Infektion sowohl in den HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen mit

niedriger Viruslast als auch in den CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen ab. In den Milzen der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Tiere mit hoher Viruslast stieg der Anteil an CD11b $^{+}$ myeloischen Zellen im Vergleich zu den naiven Tieren von 8,5 % auf das Doppelte auf 17,5 % an (s. Abb. 4.10, C).

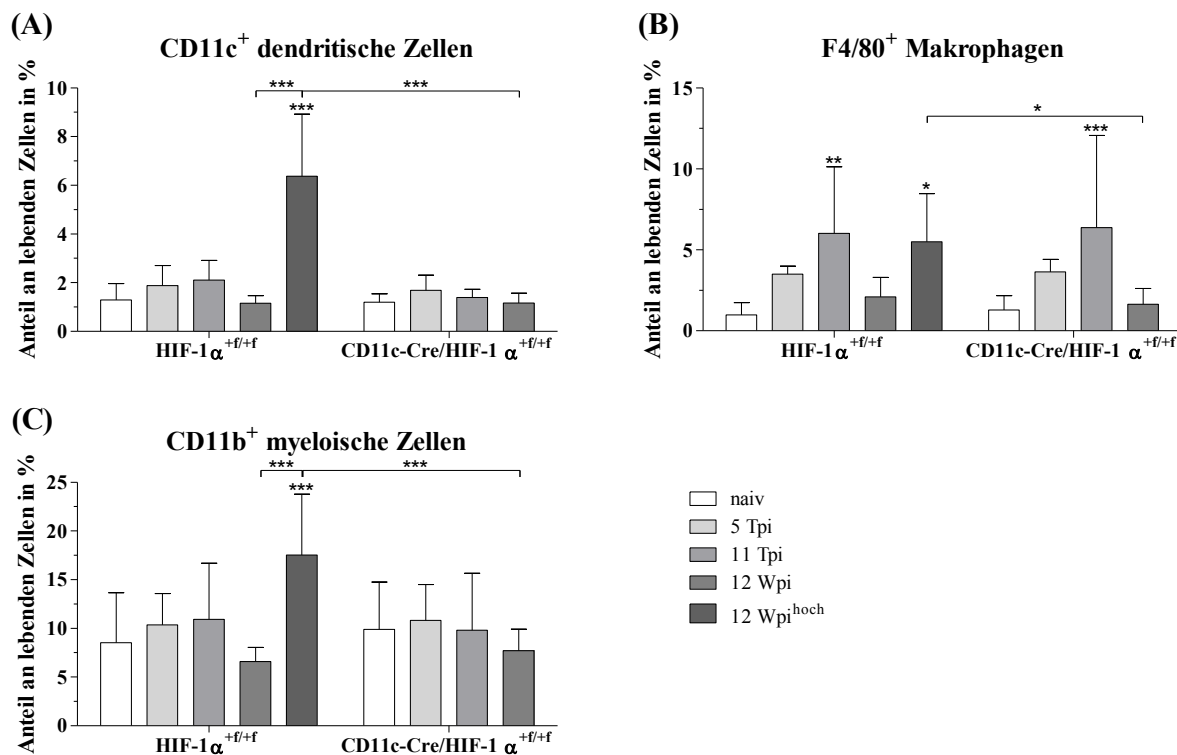


Abb. 4.10: Erhöhte Anzahl an antigenpräsentierenden Zellen in der Milz von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse nach chronischer FV Infektion

Zur Charakterisierung der Zellen in der Milz wurden diese mittels spezifischer Antikörper markiert und im Durchflusszytometer analysiert. (A,B) Die Anzahl der CD11c $^{+}$ dendritischen Zellen und F4/80 $^{+}$ Makrophagen nahm im Verlauf der Infektion zu und normalisierte sich 12 Wpi. Jedoch war deren Anzahl in den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen 12 Wpi^{hoch} weiterhin deutlich erhöht. (C) Die Zahl der CD11b $^{+}$ myeloischen Zellen stieg bei den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ und den CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen in der akuten Phase der Infektion minimal an und war 12 Wpi in den Mäusen mit geringer Viruslast nicht mehr erkennbar. In den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen mit hoher Viruslast konnte ein signifikanter Anstieg an CD11b $^{+}$ Zellen nachgewiesen werden (Mittelwerte \pm SD; naiv n=15, 5 Tpi n=8, 11 Tpi und HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi n=9, HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi^{hoch} n=7, CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ n=15).

Zusätzlich zu den Einzelfärbungen wurde der Aktivierungsstatus von dendritischen Zellen und Makrophagen im Verlauf der Infektion überprüft. Dafür wurden die Zellen analysiert, die sowohl für die Oberflächenantigene CD11c oder F4/80 als auch für den Aktivierungsmarker CD86 positiv waren. Zudem wurde die Expression von MHC I auf den CD11c $^{+}$ dendritischen Zellen näher untersucht, da die Präsentation von Peptidantigenen durch diese Zellen für die Aktivierung von CD8 $^{+}$ zytotoxischen T-Zellen notwendig ist (Zinkernagel & Doherty 1974). In Abbildung Abb. 4.11 wird der prozentuale Anteil an aktivierten CD86 $^{+}$ oder an MHC I $^{+}$ Zellen an den lebenden CD11c $^{+}$ dendritischen Zellen bzw. F4/80 $^{+}$ Makrophagen dargestellt.

Im Verlauf der akuten FV Infektion stieg die Zahl der $CD11c^+ MHC\ I^+$ bei den $HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen von 33,2 % der lebenden $CD11c^+$ dendritischen Zellen in den naiven Tieren auf 64,0 % der $CD11c^+$ dendritischen Zellen 11 Tage nach Infektion an. Auch in den $CD11cCre/HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen nahm die Anzahl der $CD11c^+ MHC\ I^+$ Zellen von 34,5 % auf 58,9 % an Tag 11 nach Infektion zu. Der Anteil an $MHC\ I^+$ Zellen an der $CD11c^+$ Population veränderte sich im Verlauf zur chronischen Infektion in den Tieren mit geringer Viruslast nur geringfügig. Auffallend war hingegen, dass 95,3 % der $CD11c^+$ Zellen in den Milzen von $HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen mit hoher Viruslast 12 Wochen nach Infektion $MHC\ I^+$ waren (s. Abb. 4.11, A). Auch die Zahl der aktivierten $CD11c^+ CD86^+$ Zellen nahm im Verlauf der akuten Infektion zu und erreichte ihr Maximum an Tag 11 nach Infektion. Während die Anzahl der $CD11c^+ CD86^+$ Zellen an der $CD11c^+$ Population in den Milzen der $HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäuse sich von 6,7 % auf 30,6 % fast verfünffachte, stieg die Zahl $CD11c^+ CD86^+$ Zellen in den $CD11cCre/HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen nur von 10,0 % auf 23,9 % der lebenden $CD11c^+$ dendritischen Zellen an. Im Verlauf der chronischen FV Infektion sank die Zahl der aktivierten dendritischen Zellen unabhängig von Viruslast und Knock-out auf Werte um 10 % (s. Abb. 4.11, B). Ebenso wie die Zahl der aktivierten dendritischen Zellen erhöhte sich auch die Zahl der aktivierten Makrophagen in der akuten Phase der FV Infektion. Das Maximum an aktivierten $F4/80^+ CD86^+$ Zellen wurde jedoch bereits 5 Tage nach Infektion erreicht. Die Zahl der $F4/80^+ CD86^+$ Zellen stieg in den Milzen der $HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäuse von 10,1 % in den naiven Tieren auf etwa das Dreifache auf 28,8 % der lebenden $F4/80^+$ Makrophagen an. Im weiteren Verlauf der Infektion sank die Zahl der aktivierten $F4/80^+ CD86^+$ Zellen konstant und erreichte ihr Minimum 12 Wochen nach Infektion. Dabei war die Anzahl der $F4/80^+ CD86^+$ Zellen mit 2,7 % der lebenden $F4/80^+$ Zellen in den Tieren mit niedriger Viruslast gegenüber den nicht infizierten Tieren deutlich verringert. In den $HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen mit hoher Viruslast hingegen entsprach die Anzahl der $F4/80^+ CD86^+$ Zellen mit 9,8 % der der naiven Mäuse. Der Verlauf der Makrophagenaktivierung verhielt sich in den $CD11cCre/HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen ähnlich. Auch bei den $CD11cCre/HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen stieg die Anzahl der aktivierten $F4/80^+ CD86^+$ Zellen von 10,7 % der lebenden $F4/80^+$ Zellen in den naiven Tieren signifikant auf 36,5 % der lebenden $F4/80^+$ Zellen an Tag 5 nach Infektion an. Bereits 11 Tage nach Infektion sankt die Zahl der aktivierten $F4/80^+ CD86^+$ Zellen um 20 % auf 16,4 % der lebenden $F4/80^+$ Zellen. Der Anteil der aktivierten $F4/80^+ CD86^+$ Zellen nahm im Verlauf der chronischen Infektion auf 6,7 % der lebenden $F4/80^+$ Makrophagen 12 Wochen nach Infektion ab (s. Abb. 4.11, C).

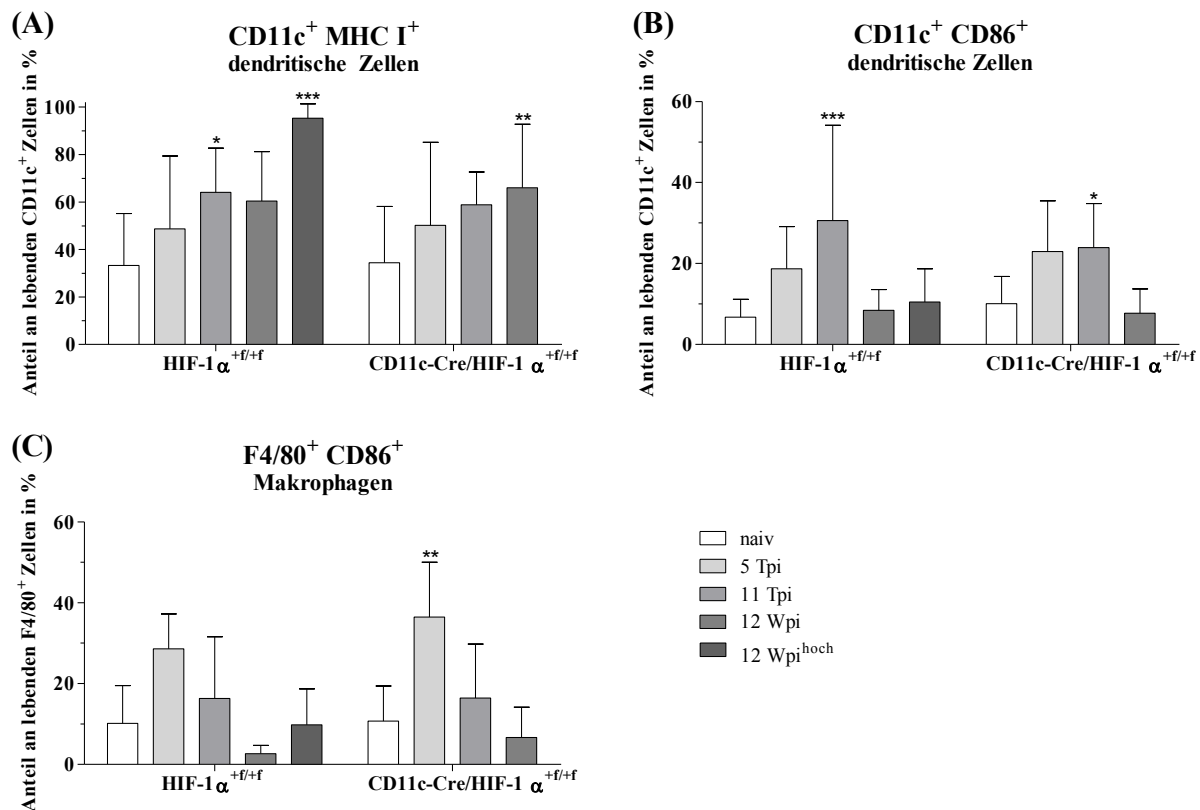


Abb. 4.11: Erhöhte Aktivierung von dendritischen Zellen und Makrophagen während der akuten FV Infektion

Zur Charakterisierung der Aktivierung und Antigenpräsentation myeloischer Zellen in der Milz wurden diese mittels spezifischer Antikörper markiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. (A) Die Anzahl der CD11c⁺ MHC I⁺ antigenpräsentierenden dendritischen Zellen, welche maßgeblich an der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen beteiligt ist, stieg im Verlauf der Infektion sowohl in HIF-1 α ^{+/+} als auch in CD11cCre/HIF-1 α ^{+/+} Mäusen stetig an. (C) Während der akuten FV Infektion nahm die Zahl der aktivierten CD11⁺ CD86⁺ dendritischen Zellen zu, sank 12 Wpi aber wieder auf den Normalwert. (C) Die maximale Aktivierung der F4/80⁺ CD86⁺ Makrophagen war bereits 5 Tpi erreicht und erreichte 12 Wpi wieder den Basalexpression (Mittelwerte \pm SD; naiv n=15, 5 Tpi n=8, 11 Tpi n=9, HIF-1 α ^{+/+} 12 Wpi n=9, 12 Wpi^{hoch} n=7, CD11cCre/HIF-1 α ^{+/+} n=15).

Neben Makrophagen, dendritischen und myeloischen Zellen wurde auch die Anzahl der Granulozyten und natürlichen Killerzellen in den Milzen bestimmt. Als Marker für die Gesamtheit der Granulozyten wurde Gr1 verwendet. Als NK-Zellen wurden alle für die NK-Zellmarker CD49b und/oder NK1.1 positiven Zellen definiert, welche für den allgemeinen T-Zellmarker CD3 negativ waren.

Die Zahl der Gr1⁺ Granulozyten veränderte sich im Verlauf von akuter und chronischer FV Infektion sowohl in den HIF-1 α ^{+/+} als auch den CD11cCre/HIF-1 α ^{+/+} Mäusen nur geringfügig. Während sich der Anteil an Gr1⁺ Zellen nach 12 Wochen in den Mäusen mit geringer Viruslast gegenüber dem der naiven Tiere nicht veränderte, stieg deren Anzahl in den HIF-1 α ^{+/+} Mäusen mit hoher Viruslast signifikant von 3,4 % auf 11,3 % der lebenden Milzzellen an (s. Abb. 4.12, A). Die Anzahl der NK-Zellen stieg sowohl in den HIF-1 α ^{+/+} als

auch den CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen von etwa 7,0 % in den naiven Tieren auf 8,6 % an Tag 5 an. 11 Tage nach Infektion erreichte die Anzahl der NK-Zellen ihr Minimum von etwa 4,4 % der lebenden Zellen der Milz und normalisierte sich im Verlauf der chronischen Infektion wieder. Die Zahl der NK-Zellen in den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen mit hoher Viruslast war mit 7,6 % der lebenden Zellen im Vergleich zu den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Tieren mit niedriger Viruslast mit 5,1 % leicht erhöht (s. Abb. 4.12, B).

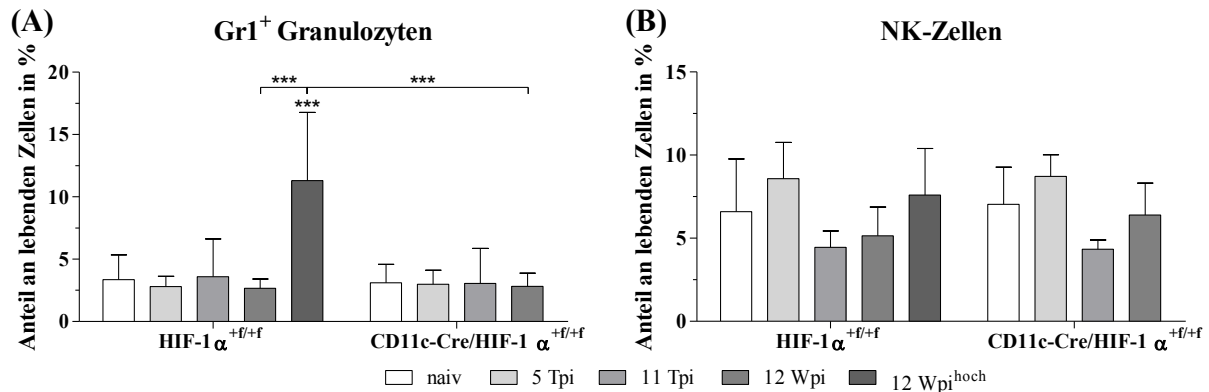


Abb. 4.12: Chronische FV Infektion resultiert in erhöhter Granulozytenzahl in HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen 12 Wpi^{hoch}

Zur Charakterisierung der Zellen in der Milz wurden diese mittels spezifischer Antikörper markiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. (A) Die Anzahl der Gr1⁺ Granulozyten veränderte sich im Verlauf der akuten Infektion nicht, verdreifachte sich aber 12 Wpi^{hoch} in den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen. (B) Nach einem leichten Anstieg 5 Tpi nahm die Zahl der NK-Zellen 11 Tpi um ein Drittel ab und erholte sich im Verlauf der chronischen Infektion wieder (Mittelwerte \pm SD; naiv n=15, 5 Tpi n=8, 11 Tpi n=9, HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi n=9, 12 Wpi^{hoch} n=7, CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ n=15).

4.3.2 Chronische FV Infektion resultiert in verringerter adaptiver Immunantwort in HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen mit hoher Viruslast

Um die gesamte Immunantwort auf die akute und chronische Virusinfektion erfassen zu können, wurde auch das Verhalten der Zellen des adaptiven Immunsystems näher charakterisiert. Für die Identifikation der T-Zellen wurden CD4 als Oberflächenmarker für T-Helferzellen und CD8a als Marker für die zytotoxischen T-Zellen verwendet. Die Gesamtheit der B-Zellen wurde mit CD19 als Oberflächenmarker erfasst.

Die Zahl der CD4⁺ T-Helferzellen sank in der frühen Phase der FV Infektion um mehr als die Hälfte: von 30,0 % auf 11,7 % der lebenden Zellen an Tag 5 in den HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen und von 27,3 % auf 11,6 % in den CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen. Bereits 11 Tage nach Infektion hatte sich die Anzahl der T-Helferzellen mit 39,2 % in HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen und 44,7 % CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen wieder erholt und überstieg die Anzahl von CD4⁺ T-Helferzellen in den naiven Mäusen. Im Verlauf von akuter zu chronischer Infektion nahm die Anzahl der T-Helferzellen in den Tieren mit geringer Viruslast nur in geringem Maße ab, während die Zahl der CD4⁺ T-Helferzellen in den HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen mit hoher Viruslast mit nur 8 % der lebenden Zellen signifikant reduziert war (s. Abb. 4.13, A). Auch die Anzahl der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen sank im Vergleich zu den naiven Tieren 5 Tage nach Infektion von 16,7 % auf 12,5 % der lebenden Zellen in HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen und von 17,0 % auf 11,7 % der lebenden Zellen in den CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen. Im Verlauf von akuter zu chronischer FV Infektion erholte sich die Zahl der zytotoxischen T-Zellen. Jedoch sank die Zahl der zytotoxischen T-Zellen nach 12 Wochen in den HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen mit hoher Viruslast nochmals und signifikant auf 6,5 % der lebenden Milzzellen (s. Abb. 4.13, B). Während die Zahl der CD4⁺ und CD8⁺ Immunzellen bereits an Tag 5 nach Infektion abnahm, blieb die Zahl der B-Zellen in der frühen Phase der akuten Infektion konstant. Erst 11 Tage nach Infektion sank die Zahl der CD19⁺ B-Zellen von 33,0 % der lebenden Zellen in den naiven auf 15,5 % der lebenden Zellen in infizierten HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen und von 35,6 % auf 14,67 % der lebenden Zellen in den CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen. Nach 12 Wochen chronischer Infektion hatte sich die Zahl der CD19⁺ B-Zellen in den Tieren mit niedriger Viruslast wieder erholt, während ihre Anzahl in den HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen mit hoher Viruslast signifikant auf 8,2 % der lebenden Milzzellen gesunken war (s. Abb. 4.13, C).

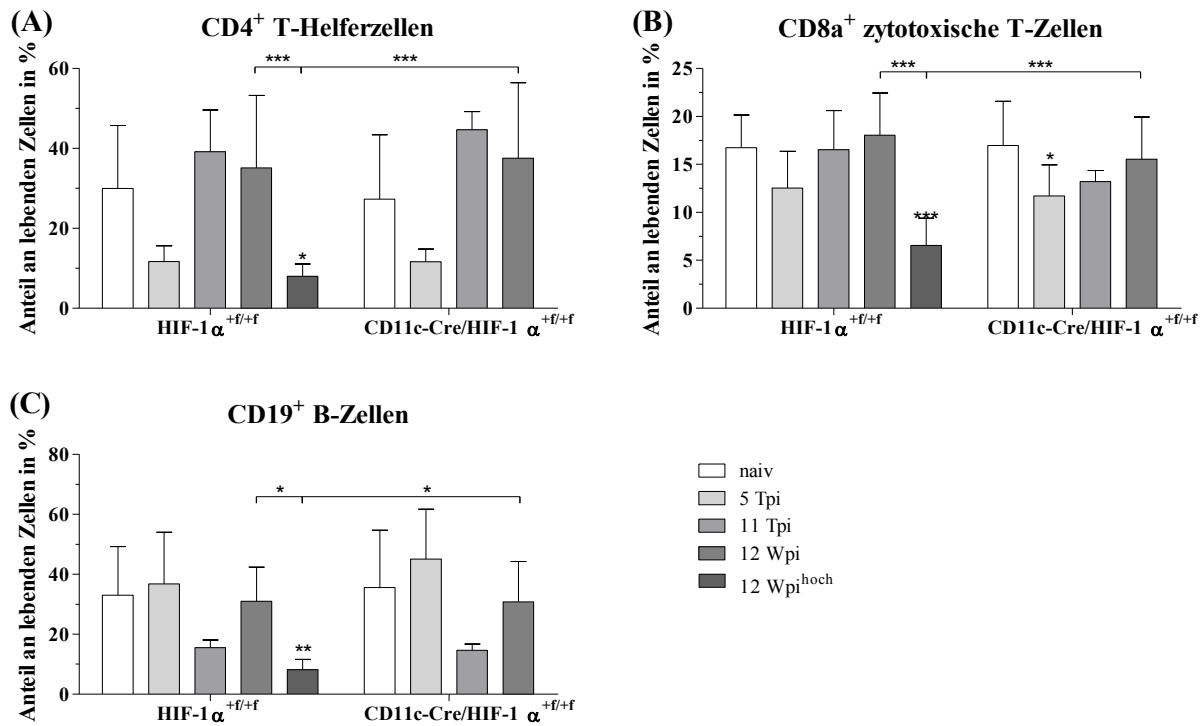


Abb. 4.13: Verringerte adaptive Immunantwort in HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen mit hoher Viruslast nach chronischer FV Infektion

Zur Charakterisierung der Zellen in der Milz wurden diese mittels spezifischer Antikörper markiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. (A) Die Zahl der CD4⁺ T-Helferzellen sank 5 Tpi um zwei Drittel, normalisierte sich aber bereits 11 Tpi wieder. 12 Wpi^{hoch} war die Zahl der CD4⁺ Zellen in den HIF-1 α ^{+f/+f} erneut und signifikant reduziert. (B) Die Population der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen blieb im Verlauf der FV Infektion stabil, sank jedoch 12 Wpi^{hoch} ebenfalls um zwei Drittel. (C) Die Zahl der CD19⁺ B-Zellen nahm ab 11 Tpi deutlich ab, erholte sich aber 12 Wpi wieder. In den HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen mit hoher Viruslast erholte sich die Population nicht und erreichte 12 Wpi^{hoch} ihr Minimum (Mittelwerte \pm SD; naiv n=15, 5 Tpi n=8, 11 Tpi n=9, HIF-1 α ^{+f/+f} 12 Wpi n=9, 12 Wpi^{hoch} n=7, CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} n=15).

Um eine eventuelle Beteiligung von regulatorischen T-Zellen an der Reduktion der zytotoxischen T-Zellantwort in den chronisch infizierten Tieren mit hoher Viruslast nachweisen zu können, wurden diese Zellen für den 12 Wochen Zeitpunkt näher analysiert. Als regulatorische T-Zellen wurden Zellen charakterisiert, welche für die Marker CD4, CD25 und Foxp3 positiv waren.

Der Anteil an CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen war mit etwa 1 % der lebenden Milzzellen sowohl in den naiven als auch den chronisch infizierten HIF-1 α ^{+f/+f} und CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen mit hoher und niedriger Viruslast ähnlich (s. Abb. 4.14, A). Auffallend war hingegen, dass der Anteil an CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen an der CD4⁺ Population mit 21,3 % in den HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen mit hoher Viruslast signifikant erhöht war. In allen anderen Tieren betrug der Anteil der regulatorischen T-Zellen an der lebenden CD4⁺ Population nur etwa 5-6 % (s. Abb. 4.14, B).

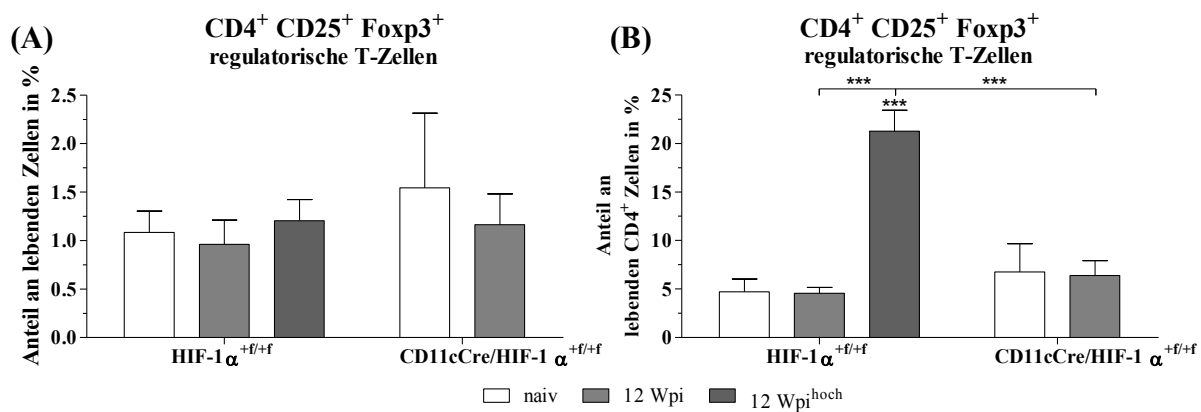


Abb. 4.14: Chronische FV Infektion resultiert in einem erhöhten Anteil von regulatorischen T-Zellen in der CD4⁺ Population in HIF-1α^{+/f/f} Mäusen mit hoher Viruslast

Zur Charakterisierung der Zellen in der Milz wurden diese mittels spezifischer Antikörper markiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. (A) Während keine Unterschiede in der Gesamtzahl der CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen in den Milzen naiver und infizierter Mäuse detektiert werden konnten, war die Anzahl an CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation (B) in den HIF-1α^{+/f/f} Mäusen mit hoher Viruslast signifikant erhöht (Mittelwerte ± SD; naiv n=2, 12 Wpi n=4).

4.3.3 Erhöhte Anzahl an myeloischen Suppressorzellen in der Milz nach chronischer Virusinfektion

Bei den myeloischen Suppressorzellen (engl. *myeloid derived suppressor cell*, MDSC) handelt es sich um eine heterogene Gruppe myeloischer Vorläufer- und unreifer myeloischer Zellen. In einem gesunden Individuum differenzieren diese rasch zu reifen myeloischen Zellen, wie Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, aus. Bei Entzündungen, Infektionen oder bei Krebserkrankungen steigt die Zahl der MDSCs im Organismus an und wirkt dort supprimierend auf das Immunsystem (Gabrilovich et al. 2012). In der Maus werden MDSCs als CD11b⁺ Gr1⁺ positive Zellen definiert.

Im Verlauf der Infektion blieb der Anteil der CD11b⁺ Gr1⁺ MDSCs an den lebenden Milzzellen mit Werten um 2 % sowohl in den HIF-1α^{+/f/f} als auch den CD11cCre/HIF-1α^{+/f/f} Tieren relativ konstant. Dabei nahm die Anzahl der CD11b⁺ Gr1⁺ Zellen in CD11cCre/HIF-1α^{+/f/f} Mäusen während der akuten Phase der Infektion in der Tendenz leicht ab. Nach chronischer Virusinfektion stieg die Zahl der CD11b⁺ Gr1⁺ MDSCs in den HIF-1α^{+/f/f} Mäusen mit hoher Viruslast signifikant auf 9,2 % der lebenden Milzzellen an, während in den anderen Tieren kein Unterschied zu den naiven Tieren nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 4.15, A). Da humane MDSCs kein MHC II auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (Almand et al. 2001), wurde auch die Population der CD11b⁺ Gr1⁺ MHC II⁻ Zellen analysiert. Die Zahl der CD11b⁺ Gr1⁺ MHC II⁻ MDSCs war gegenüber den CD11b⁺ Gr1⁺ Zellen um etwa ein Drittel reduziert, während beide Populationen sich im Verlauf von akuter zu chronischer FV Virusinfektion proportional zueinander verhielten (s. Abb. 4.15, B).

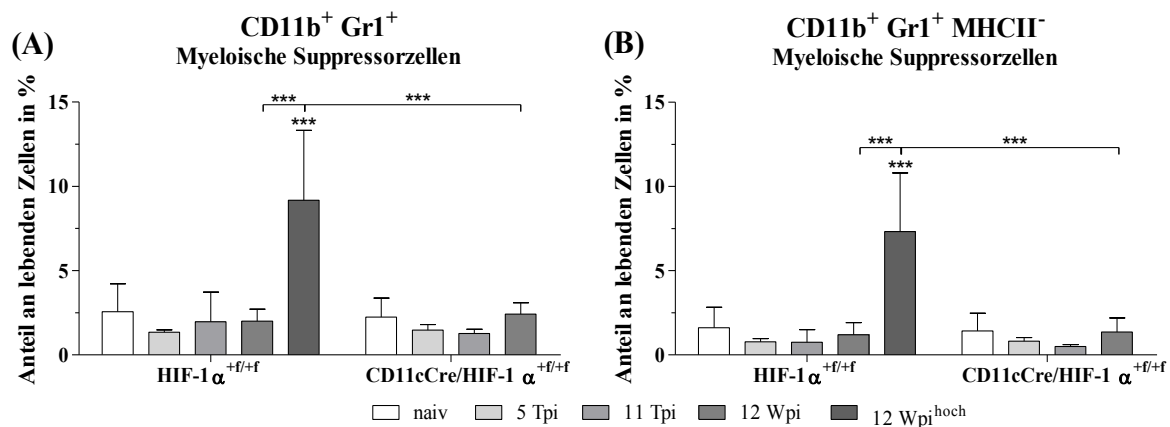


Abb. 4.15: Signifikanter Anstieg myeloischer Suppressorzellen in der Milz nach chronischer FV Infektion in HIF-1α^{+/+} Mäusen

Zur Charakterisierung der Zellen in der Milz wurden diese mittels spezifischer Antikörper markiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Myeloische Suppressorzellen (MDSC) der Maus werden als CD11b⁺ Gr1⁺ Zellen beschrieben. (A) Während die Zahl der MDSCs im Verlauf der FV Infektion sowohl in HIF-1α^{+/+} als auch in CD11cCre/HIF-1α^{+/+} Mäusen tendenziell abnahm, stieg deren Anzahl 12 Wpi^{hoch} signifikant an. (B) Der Anteil an CD11b⁺ Gr1⁺ MHC II⁻ MDSCs verhielt sich im Verlauf der Virusinfektion proportional zu den CD11b⁺ Gr1⁺ Zellen, war jedoch im direkten Vergleich um ein Drittel geringer (Mittelwerte ± SD; naiv n=15, 5 Tpi n=8, 11 Tpi n=9, HIF-1α^{+/+} 12 Wpi n=9, 12 Wpi^{hoch} n=7, CD11cCre/HIF-1α^{+/+} n=15).

4.3.4 Zunehmende Aktivierung von CD8a⁺ zytotoxischen T-Zellen bei akuter FV Infektion

Um den Aktivierungsstatus der zytotoxischen T-Zellen im Verlauf der Virusinfektion ermitteln zu können, wurden CD8a⁺ T-Zellen in der Milz mit verschiedenen Aktivierungsmarkern angefärbt. Die Aktivierung von T-Zellen führt zu einer erhöhten Expression von Sialophorin oder auch CD43 an ihrer Zelloberfläche, welches unter anderem für die Kostimulation und das Zellüberleben eine wichtige Rolle spielt. Der induzierbare T-Zell Kostimulator (ICOS) oder CD278 wird auf aktivierten T-Zellen exprimiert, ist ein Kostimulator der T-Zellproliferation und bei der humoralen Immunantwort involviert. CD69 ist ein Marker, der bereits in der frühen Phase der Lymphozytenaktivierung exprimiert wird.

Die Zahl der aktivierten CD8a⁺ CD43⁺ T-Zellen nahm während der frühen Phase der Infektion sowohl bei den HIF-1α^{+/+} als auch den CD11cCre/HIF-1α^{+/+} Mäusen nur in geringem Maße zu. Nach 11 Tagen Infektion stieg die Zahl der aktivierten CD8a⁺ CD43⁺ T-Zellen jedoch signifikant von 8,1 % in den naiven HIF-1α^{+/+} Mäusen auf 32,2 % und von 7,1 % in den naiven CD11cCre/HIF-1α^{+/+} Mäusen auf 36,6 % der lebenden CD8a⁺ T-Zellen an. In der chronischen Phase der FV Infektion normalisierte sich die Zahl der aktivierten T-Zellen in den Tieren mit geringer Viruslast wieder, während die Anzahl der CD8a⁺ CD43⁺ Zellen mit 28,2 % der lebenden CD8a⁺ T-Zellen weiterhin signifikant erhöht war (s. Abb. 4.16, A). Die Zahl der aktivierten CD8a⁺ CD278⁺ T-Zellen nahm in der frühen Phase der FV

Infektion in der Tendenz leicht zu und war an Tag 11 nach Infektion sowohl in $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ als auch den $\text{CD11cCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ Mäusen signifikant erhöht. Dabei stieg die Anzahl der CD8a^+ CD278^+ T-Zellen von 5,2 % in den naiven auf 15,5 % der lebenden CD8a^+ T-Zellen in den für 11 Tage infizierten $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ Mäusen und von 6,1 % in den naiven auf 20,8 % der lebenden CD8a^+ T-Zellen in den für 11 Tage infizierten $\text{CD11cCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ Mäusen an. In der chronischen Phase der Infektion sank der Wert der aktivierten CD8a^+ CD278^+ T-Zellen in allen Tieren auf etwa 8,7 % der lebenden CD8a^+ T-Zellen (s. Abb. 4.16, B). Nach 5 Tagen Infektion stieg die Zahl der CD8a^+ CD69^+ T-Zellen leicht an, sank 11 Tage nach Infektion sowohl in $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ als auch den $\text{CD11cCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ Mäusen von 3,5 % CD8a^+ CD69^+ T-Zellen in naiven Tieren auf 1 % der lebenden CD8^+ T-Zellen. In der chronischen Phase der FV Infektion stieg die Zahl der CD8a^+ CD69^+ T-Zellen auf etwa 6 % der lebenden T-Zellen in den Tieren mit geringer Viruslast an und war in den $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ Mäusen mit hoher Viruslast mit 11,8 % der lebenden CD8a^+ T-Zellen signifikant erhöht (s. Abb. 4.16, C).

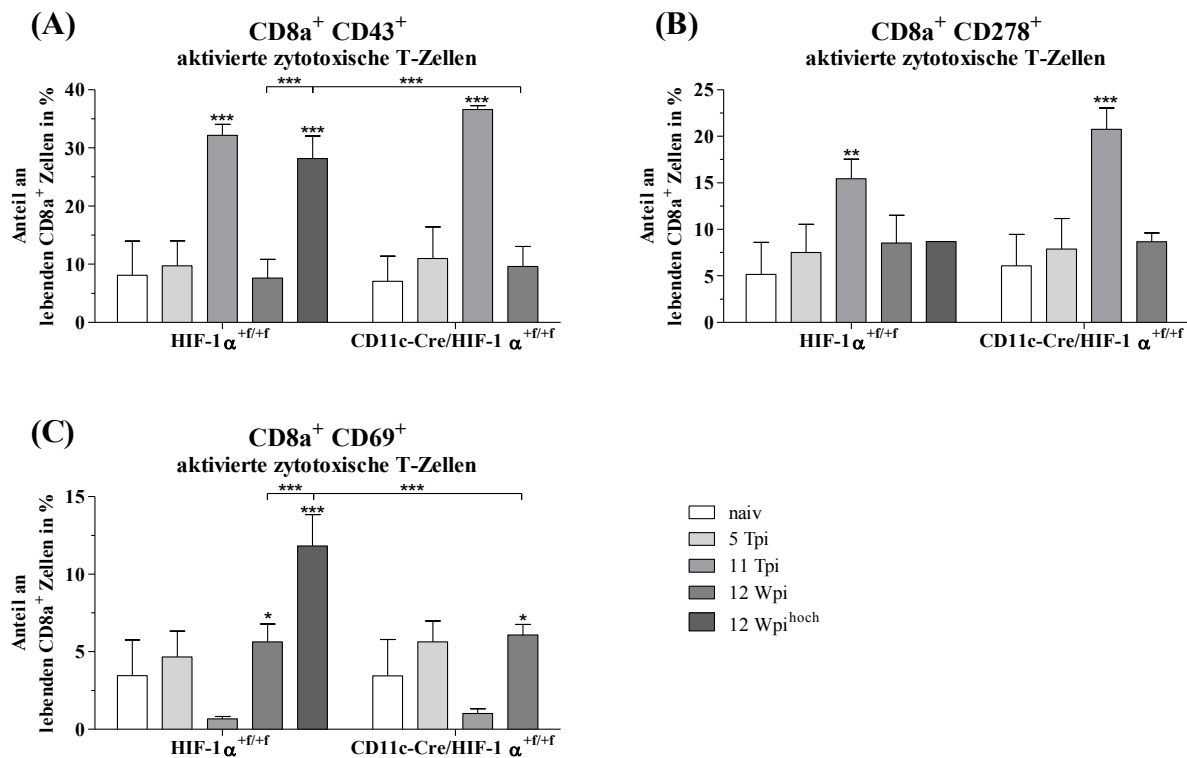


Abb. 4.16: Zunehmende Aktivierung von CD8a^+ zytotoxischen T-Zellen bei akuter FV Infektion
 Zur Charakterisierung der Zellen in der Milz wurden diese mittels spezifischer Antikörper markiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Die Zahl der aktivierten (A) CD43 und (B) CD278 positiven zytotoxischen T-Zellen erreichte 11 Tpi ihr Maximum, (C) während die höchste Anzahl der für den frühen Aktivierungsmarker CD69 positiven Zellen sein Minimum erreichte. In der chronischen Phase der Infektion kam es in den Tieren mit hoher Viruslast zu einem weiteren Anstieg der aktivierten CD8a^+ CD69^+ T-Zellen und einer Reaktivierung der CD8a^+ CD43^+ Zellen (Mittelwerte \pm SD; naiv n=7, 5 Tpi n=4, 11 Tpi n=3, 12 Wpi n=8, $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ 12 Wpi^{hoch} n=3; CD8^+ CD278^+ naiv n=4, 5 Tpi n=4, 11 Tpi n=3, 12 Wpi n=4, $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ 12 Wpi^{hoch} n=1).

Um die zytotoxische Aktivität der CD8a⁺ T-Zellen analysieren zu können, wurden die für den Aktivierungsmarker CD43 positiven Zellen zusätzlich noch auf weitere Marker untersucht. Zur Charakterisierung der degranulierenden Zellen wurden die CD107a⁺ Zellen erfasst. Zudem wurde die Serinprotease Granzym B (GzmB) intrazellulär angefärbt, diese besitzt eine lytische Aktivität und kann sowohl von zytotoxischen T-Zellen als auch NK-Zellen ausgeschüttet werden.

Die Zahl der aktivierten degranulierenden CD8a⁺ CD43⁺ CD107a⁺ Zellen verdoppelte sich 5 Tage nach Infektion in HIF-1α^{+f/+f} und CD11cCre/HIF-1α^{+f/+f} Mäusen von etwa 1,7 % auf 3,4 % der lebenden CD8a⁺ T-Zellen. Im weiteren Verlauf der Infektion sank der Anteil an degranulierenden Zellen innerhalb der CD8a⁺ T-Zellpopulation, stieg jedoch in den chronisch infizierten HIF-1α^{+f/+f} Mäusen mit hoher Viruslast signifikant auf 7,6 % der lebenden CD8a⁺ T-Zellen an (s. Abb. 4.17, A). In der frühen Phase der akuten FV Infektion veränderte sich die Zahl der CD8a⁺ CD43⁺ GzmB⁺ T-Zellen nicht und stieg 11 Tage nach Infektion signifikant von 3,9 % auf 32,0 % der lebenden CD8a⁺ T-Zellen in den HIF-1α^{+f/+f} Mäusen und von 2,2 % auf 39,6 % der lebenden CD8a⁺ T-Zellen in den CD11cCre/HIF-1α^{+f/+f} Mäusen. Dabei war der Anteil an CD8a⁺ CD43⁺ GzmB⁺ T-Zellen in den CD11cCre/HIF-1α^{+f/+f} Mäusen tendenziell höher als in den HIF-1α^{+f/+f} Mäusen. In der chronischen Phase der Infektion normalisierte sich die Anzahl der CD8a⁺ CD43⁺ GzmB⁺ T-Zellen in den Tieren mit niedriger Viruslast, während die Zahl der CD8a⁺ CD43⁺ GzmB⁺ T-Zellen mit 13,3 % der lebenden CD8a⁺ T-Zellen in den HIF-1α^{+f/+f} Mäusen ebenfalls erhöht war (s. Abb. 4.17, B).

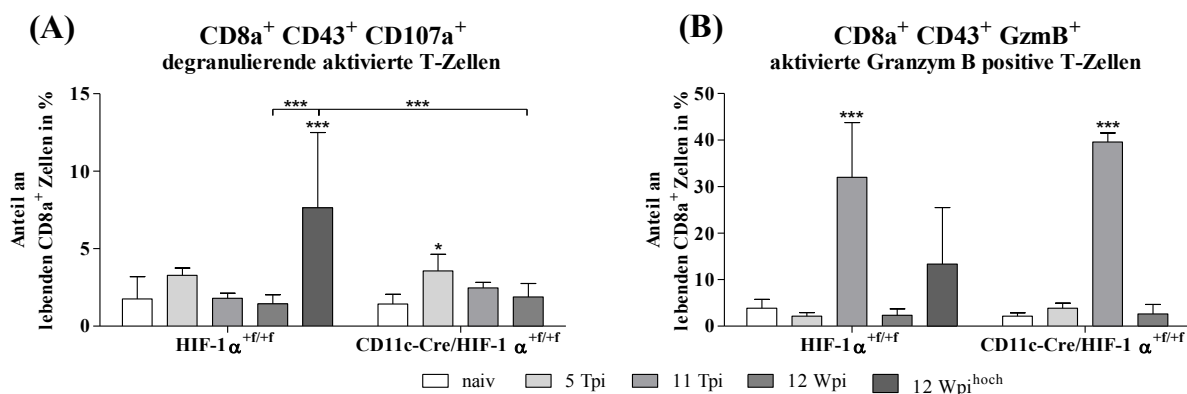


Abb. 4.17: Höchster Anteil Granzym B positiver T-Zellen 11 Tpi in CD11cCre/HIF-1α^{+f/+f} Mäusen

Zur Charakterisierung der Zellen in der Milz wurden diese mittels spezifischer Antikörper markiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. (A) Die Anzahl der aktivierten, degranulierenden CD43⁺ CD107a⁺ T-Zellen nahm im Verlauf von akuter zu chronischer Infektion zu. (B) Dahingegen stieg die Zahl der Granzym B enthaltenden aktivierten T-Zellen 11 Tpi auf ein Maximum, dabei war deren Anzahl in den CD11cCre/HIF-1α^{+f/+f} Mäusen im Vergleich zu den HIF-1α^{+f/+f} Mäusen deutlich erhöht (Mittelwerte ± SD; naiv n=7, 5 Tpi n=4, 11 Tpi n=3, 12 Wpi n=8, HIF-1α^{+f/+f} 12 Wpi^{hoch} n=3).

4.4 Unterschiede in der Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen aus dem Knochenmark FV-infizierter Mäusen

Die Aktivierung und zytotoxische Aktivität von CD8a⁺ T-Zellen durch dendritische Zellen wurde zusätzlich zu der Markierung primärer Zellen aus der Milz in einem *in vitro* Assay bestimmt. Dafür wurden BmDCs aus FV-infizierten Mäusen zusammen mit zytotoxischen T-Zellen *in vitro* kokultiviert. Die für den Assay eingesetzten CD8a⁺ T-Zellen aus OT-1 Mäusen besitzen einen veränderten T-Zellrezeptor, der spezifisch ein bestimmtes an den MHC I Komplex gebundenes Ovalbuminpeptidfragment erkennt. Da 5 Tage nach Infektion *in vivo* noch keine T-Zellaktivierung nachgewiesen werden konnte, wurden der *in vitro* Assay nur mit dendritischen Zellen aus Kontrolltieren und für 11 Tage und 12 Wochen infizierten Mäusen durchgeführt.

4.4.1 Keine Einschränkung der Vitalität von T-Zellen nach Kokultur mit dendritischen Zellen

Sowohl Propidiumiodid als auch FVD sind als Farbstoffe geeignet, um tote Zellen anzufärben und damit von der Analyse auszuschließen. Jedoch können diese Farbstoffe keine Information darüber liefern, ob die nicht-gefärbten Zellen vital oder bereits apoptotisch sind. Daher wurde zusätzlich der Anteil an apoptotischen T-Zellen durch die Färbung mit Annexin V bestimmt. Die Kokultivierung von BmDCs aus Kontrolltieren und mit dem FV-infizierten Mäusen führte zu keiner Einschränkung der Vitalität der CD8a⁺ zytotoxischen T-Zellen. Sowohl bei den mit BmDCs aus HIF-1 α ^{+f/+f} als auch den mit BmDCs aus CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen kokultivierten T-Zellen umfasste der Anteil an lebenden, vitalen Zellen in allen Proben mehr als 75 % der gemessenen CD8a⁺ T-Zellen. Während durchschnittlich 16 % der T-Zellen tot waren, konnten nur 2 % der CD8a⁺ T-Zellen nach Kokultur mit BmDCs aus HIF-1 α ^{+f/+f} und CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Kontrollen als apoptotisch definiert werden. Der mit 8,0 % der CD8a⁺ T-Zellen höchste Anteil an apoptotischen Zellen wurde bei der Kokultur mit BmDCs aus 12 Wochen infizierten CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen nachgewiesen (s. Abb. 4.18).

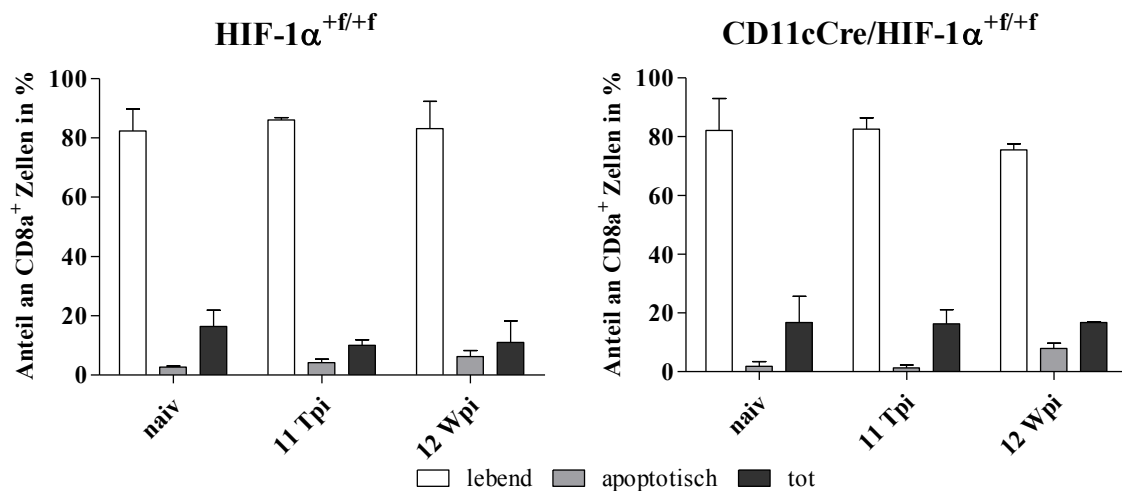


Abb. 4.18: Kokultivierung mit BmDCs führt zu keiner Einschränkung in der Vitalität der T-Zellen

Die Vitalität der T-Zellen, welche mit BmDCs aus FV-infizierten Mäusen kokultiviert wurden, wurde durch die Färbung mit Annexin V und Propidiumiodid und anschließende Analyse im Durchflusszytometer kontrolliert. Der Anteil an lebenden, vitalen Zellen umfasste in allen Proben mehr als 75 % der gemessenen CD8a⁺ T-Zellen (Mittelwerte \pm SD; n=3).

4.4.2 Kokultur mit BmDCs aus FV-infizierten Mäusen resultiert in erhöhter Anzahl an aktivierten, degranulierenden und Granzym B positiven zytotoxischen T-Zellen

Ebenso wie bei den Milzzellen wurde auch die Aktivität der T-Zellen nach Kokultur mit BmDCs aus naiven und FV-infizierten HIF-1α^{+f/f} und CD11cCre/HIF-1α^{+f/f} Mäusen mit den Aktivierungsmarkern CD43, CD278 und CD69 bestimmt.

Dendritische Zellen aus FV-infizierten Tieren waren 11 Tage nach Infektion in der Lage, eine deutliche, jedoch nicht signifikante Aktivierung der CD8a⁺ T-Zellen hervorzurufen. Dabei waren BmDCs aus HIF-1α^{+f/f} und CD11cCre/HIF-1α^{+f/f} Mäusen gleichermaßen in der Lage die CD43-Expression der zytotoxischen T-Zellen im *in vitro* Assay von etwa 5,5 % auf etwa 34 % der lebenden T-Zellen zu aktivieren. Die Kokultur von BmDCs aus chronisch infizierten Tieren führte zu keiner erhöhten Aktivierung der T-Zellen (s. Abb. 4.19, A). Nach der Kultivierung mit BmDCs aus naiven HIF-1α^{+f/f} Mäusen war die Zahl der aktivierten CD8a⁺ CD278⁺ T-Zellen im Vergleich zur Kokultur mit BmDCs aus naiven CD11cCre/HIF-1α^{+f/f} Mäusen leicht erhöht. Der Anteil an aktivierten CD8a⁺ CD278⁺ T-Zellen stieg von 14,3 % nach der Kultivierung mit BmDCs aus naiven HIF-1α^{+f/f} Mäusen auf 18,0 % der lebenden CD8a⁺ T-Zellen nach Kokultur mit BmDCs aus 11 Tage infizierten Tieren an. In der chronischen Phase der Infektion sank die Zahl der CD8a⁺ CD278⁺ T-Zellen sowohl nach der Kokultivierung mit BmDCs aus Tieren mit hoher als auch aus den Tieren mit niedriger Viruslast auf etwa 10 % der lebenden CD8a⁺ T-Zellen. Die Kokultivierung mit BmDCs aus akut oder chronisch infizierten CD11cCre/HIF-1α^{+f/f} Mäuse hatte hingegen keinen Einfluss

auf die Expression von CD278 auf der Oberfläche der CD8a⁺ T-Zellen (s. Abb. 4.19, B). Der Anteil an aktivierten CD8a⁺ CD69⁺ T-Zellen sank 11 Tage nach Infektion sowohl nach Kokultur mit BmDCs aus HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen als auch mit BmDCs aus CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen. Dabei nahm die Zahl der CD8a⁺ CD69⁺ T-Zellen, welche mit BmDCs aus HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen kokultiviert wurden, von 79,1 % auf 67,0 % der lebenden CD8⁺ T-Zellen ab. Der Anteil an nach Kokultur mit BmDCs aus naiven und 11 Tage infizierten CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen aktivierten CD8a⁺ CD69⁺ T-Zellen sank signifikant von 83,1 % auf 56,7 % der lebenden CD8a⁺ T-Zellen. In der chronischen Phase der FV Infektion stieg die Zahl der durch dendritische Zellen aktivierten CD8a⁺ CD69⁺ T-Zellen bei allen Tieren auf etwa 85 % der lebenden T-Zellen an (s. Abb. 4.19, C).

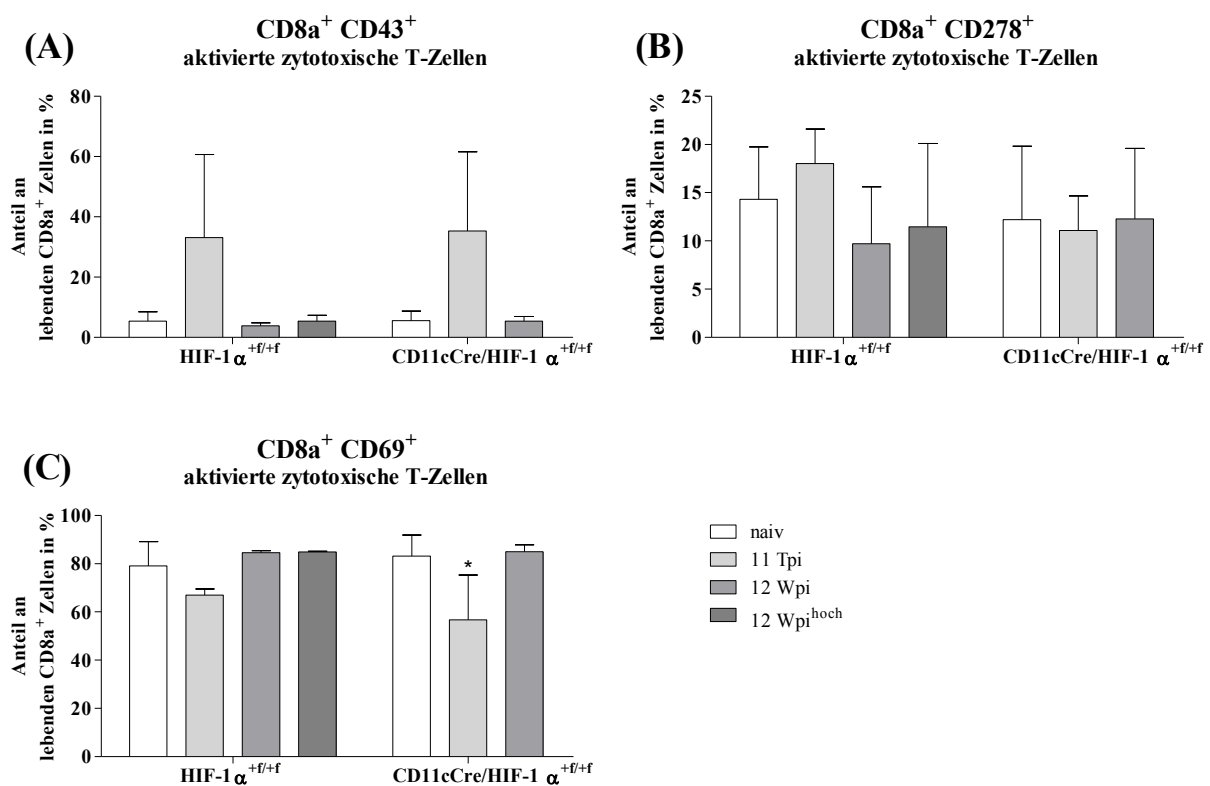


Abb. 4.19: Erhöhte CD43 Aktivierung von CD8a⁺ zytotoxischen T-Zellen bei akuter FV Infektion

Zur Charakterisierung der *in vitro* mit BmDCs kokultivierten T-Zellen wurden diese mittels spezifischer Antikörper markiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Die Zahl der aktivierten (A) CD43 und (B) CD278 positiven zytotoxischen T-Zellen erreichte 11 Tpi ihr Maximum, (C) während die Anzahl der für den frühen Aktivierungsmarker CD69 positiven Zellen zu diesem Zeitpunkt reduziert war (Mittelwerte \pm SD; naiv n=6, 11 Tpi n=6, HIF-1 α ^{+f/+f} 12 Wpi und 12 Wpi^{hoch} n=3, CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} n=6).

Ebenso wie bei den Milzzellen wurde die zytotoxische Aktivität der CD43⁺ CD8a⁺ T-Zellen auf weitere Marker untersucht. So wurde die Anzahl der degranulierenden T-Zellen mit dem Marker CD107a und die Anzahl der für die Serinprotease Granzym B (GzmB) positiven Zellen erfasst.

Die Zahl der aktivierten degranulierenden $CD8a^+ CD43^+ CD107a^+$ stieg nach der Kultivierung mit BmDCs aus 11 Tage infizierten $HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen von 2,5 % auf 6,4 % der lebenden $CD8a^+$ T-Zellen, während deren Anzahl nach Kultivierung mit BmDCs aus $CD11cCre/HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen von 2,2 % signifikant auf 11,5 % der lebenden $CD8a^+$ T-Zellen anstieg. Somit führte die Kokultur von BmDCs aus 11 Tage infizierten $CD11cCre/HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen zu einem höheren Anteil an degranulierenden $CD8a^+$ T-Zellen. Nach der Kokultivierung mit dendritischen Zellen aus chronisch infizierten Mäusen sank die Zahl der degranulierenden $CD8a^+ CD107a^+$ Zellen in allen Proben auf etwa 0,9 % der lebenden $CD8a^+$ T-Zellen und war damit gegenüber der Kokultur mit BmDCs aus akut infizierten $CD11cCre/HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen signifikant reduziert (s. Abb. 4.20, A). Bei Betrachtung der akuten FV Infektion stieg der Anteil an durch BmDCs aus akut infizierten $HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen aktivierten $CD8a^+ CD43^+ GzmB^+$ T-Zellen von 4,8 % auf 12,1 % der lebenden $CD8a^+$ T-Zellen an. Dendritische Zellen aus 11 Tage infizierten $CD11cCre/HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen führten zu einer Zunahme der $CD8a^+ CD43^+ GzmB^+$ T-Zellen von 4,5 % auf 16,8 % der lebenden $CD8a^+$ T-Zellen. Somit führten dendritische Zellen aus infizierten $CD11cCre/HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen in der Tendenz zu einem höheren Anteil an $CD8a^+ CD43^+ GzmB^+$ T-Zellen als BmDCs aus $HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen. In der chronischen Phase der Infektion sank die Anzahl der durch BmDCs aktivierten $CD8a^+ CD43^+ GzmB^+$ T-Zellen auf durchschnittlich 1,4 % der lebenden $CD8a^+$ T-Zellen (s. Abb. 4.20, B).

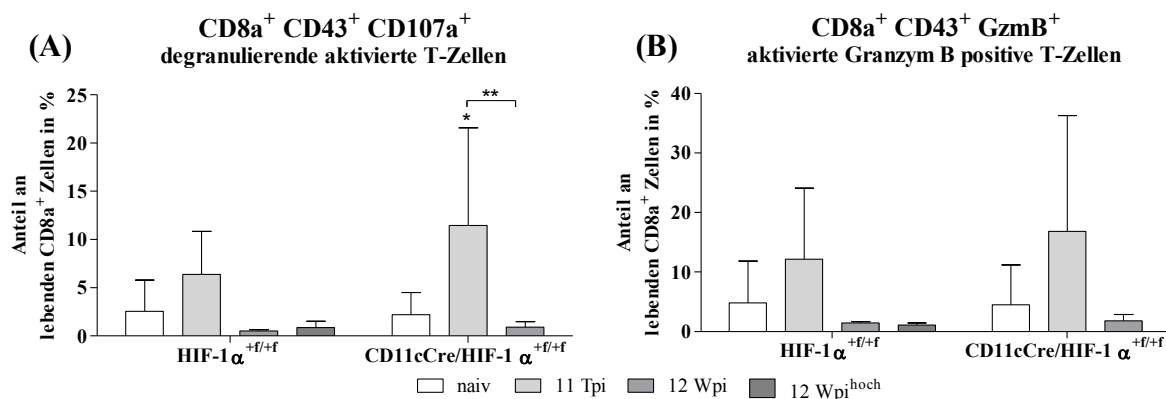


Abb. 4.20: Maximum an degranulierenden und Granzym B positiven Zellen während akuter FV Infektion

Zur Charakterisierung der *in vitro* mit BmDCs kokultivierten T-Zellen wurden diese mittels spezifischer Antikörper markiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. (A) Die Anzahl der aktivierten, degranulierenden $CD43^+ CD107a^+$ T-Zellen stieg 11 Tpi stark an und war bei den $CD11cCre/HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. (B) Auch die Zahl der Granzym B enthaltenden aktivierten T-Zellen erreichte 11 Tpi das Maximum (Mittelwerte \pm SD; naiv n=6, 11 Tpi n=6, $HIF-1\alpha^{+/+}$ 12 Wpi und 12 Wpi^{hoch} n=3, $CD11cCre/HIF-1\alpha^{+/+}$ n=6).

4.5 Akkumulation des HIF-1 α Proteins und Genexpression in den dendritischen Zellen aus dem Knochenmark FV-infizierter Mäuse

Für die FV Infektion wurden Mäuse mit einem konditionellen HIF-1 α Knock-out in den CD11c⁺ dendritischen Zellen verwendet. Da die Anzahl der dendritischen Zellen in der Maus sehr gering ist, wurden für die weitere Untersuchung der HIF-1 α Proteinexpression und der Expression unterschiedlicher Gene BmDCs verwendet. Da deren FV mRNA Genexpression, wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, proportional zur Viruslast war, könnten eventuelle Effekte der FV Infektion auf die dendritischen Zellen auch *in vitro* nachzuweisen sein.

Die mRNA Expression in den BmDCs wurde mittels Echtzeit-PCR bestimmt und auf das nicht regulierte ribosomale Protein als Referenzgen bezogen. Der Mittelwert der normoxischen naiven HIF-1 α ^{+f/+f} Proben wurde gleich eins gesetzt und alle weiteren Proben darauf bezogen.

4.5.1 Erhöhte mRNA-Expression und Proteinakkumulation von HIF-1 α unter Hypoxie in den dendritischen Zellen akut infizierter Mäuse

Vor der Isolation der mRNA wurden die BmDCs für 6 h bei einer Sauerstoffkonzentration von 21 % (Normoxie) bzw. 3 % (Hypoxie) inkubiert. Anschließend wurde die HIF-1 α Genexpression in den BmDCs aus naiven, akut und chronisch infizierten HIF-1 α ^{+f/+f} und CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen bestimmt.

Die normoxische HIF-1 α mRNA Expression stieg bei den HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen nach 5 Tagen Infektion auf das Doppelte an, während sie sich sowohl bei den für 11 Tage als auch bei den für 12 Wochen infizierten Tieren mit hoher Viruslast nicht veränderte. Bei den chronisch infizierten HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen mit geringer Viruslast nahm die Expression der HIF-1 α mRNA Expression hingegen wieder zu und war doppelt so hoch wie in der naiven Kontrolle. In den CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen war die HIF-1 α mRNA Expression gegenüber der naiven HIF-1 α ^{+f/+f} Kontrolle generell um etwa zwei Drittel erhöht, jedoch 11 Tage nach Infektion in ihrer Expression gegenüber den naiven Proben um die Hälfte reduziert (s. Abb. 4.21, A).

Unter hypoxischen Bedingungen war die HIF-1 α mRNA in allen Proben der HIF-1 α ^{+f/+f} und CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen gegenüber der normoxischen HIF-1 α ^{+f/+f} Kontrolle auf das Zweifache erhöht. Im direkten Vergleich der hypoxischen Proben untereinander konnten keine Unterschiede in der HIF- α mRNA Expression zwischen HIF-1 α ^{+f/+f} und CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Tieren festgestellt werden. In der frühen Phase der akuten FV Infektion verdoppelte sich die HIF- α mRNA Expression in den BmDCs gegenüber den naiven Hypoxiekontrollen und sank an Tag 11 auf den Wert der normoxischen Kontrolle. In der chronischen Phase der Infektion war

die HIF- α mRNA Expression im Vergleich zu den naiven Kontrollen unter Hypoxie nicht erhöht (s. Abb. 4.21, B).

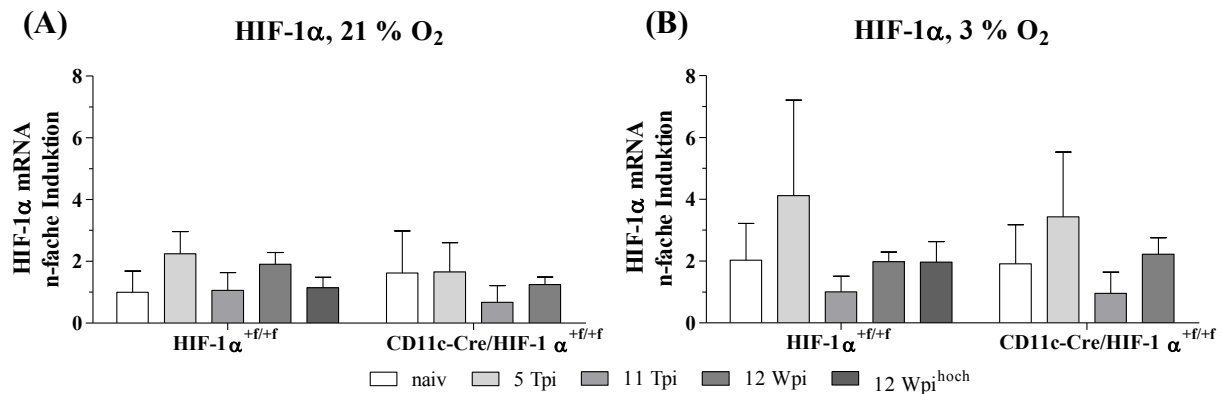


Abb. 4.21: Induktion der HIF-1 α mRNA in den dendritischen Zellen 5 Tage *post infectionem* unter Hypoxie

Die Analyse der Genexpression in dendritischen Zellen aus dem Knochenmark naiver und FV-infizierter Mäuse erfolgte mittels Echtzeit-PCR. Alle Werte wurden auf den Mittelwert der naiven HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse als Kontrolle bezogen. Die Expression der HIF-1 α mRNA war sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen 5 Tpi im Vergleich zur naiven Kontrolle bei HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen deutlich erhöht, während dies bei den CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen nur unter 3 % O₂ beobachtet werden konnte (Mittelwerte \pm SD; naiv n=10, 5 Tpi n=8, 11 Tpi n=6, HIF-1 α ^{+f/+f} 12 Wpi n=7, HIF-1 α ^{+f/+f} 12 Wpi^{hoch} n=5, CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} 12 Wpi n=9).

Für den Proteinnachweis wurden die BmDCs für 4h unter Normoxie bzw. Hypoxie inkubiert. Anschließend wurde die HIF-1 α Proteinakkumulation mittels spezifischer Antikörper im Western Blot nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

Unter normoxischen Bedingungen konnten in den BmDCs aus den HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen nur geringe Mengen an HIF-1 α Protein nachgewiesen werden. Unter Hypoxie waren bei den BmDCs aus naiven und 5 Tage infizierten Mäusen nur vergleichsweise schwache Banden zu erkennen. Nach 11 Tagen Infektion konnte die höchste HIF-1 α Proteinakkumulation detektiert werden, welche in der chronischen Phase der Infektion wieder stark abnahm. Jedoch war die Proteinexpression im direkten Vergleich zu den naiven hypoxischen HIF-1 α ^{f/+f} Kontrollen weiterhin deutlich erhöht (s. Abb. 4.22).

Auch in den Proben aus den CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen konnten unter Normoxie nur sehr schwache HIF-1 α Protein Banden gezeigt werden. Aufgrund der Deletion des Exon 2 des HIF-1 α Gens in einem Großteil, aber nicht in allen der CD11c⁺ Zellen, konnte in den CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen sowohl das verkürzte als auch das vollständige HIF-1 α Protein detektiert werden. Die Akkumulation des HIF-1 α Proteins war bei den CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen sowohl bei Normoxie als auch bei Hypoxie ähnlich ausgeprägt wie bei den HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen. Auch hier erfolgte die höchste Induktion des HIF-1 α Proteins 11 Tage nach Infektion und nahm im Verlauf von akuter zu chronischer Infektion ab (s. Abb. 4.23).

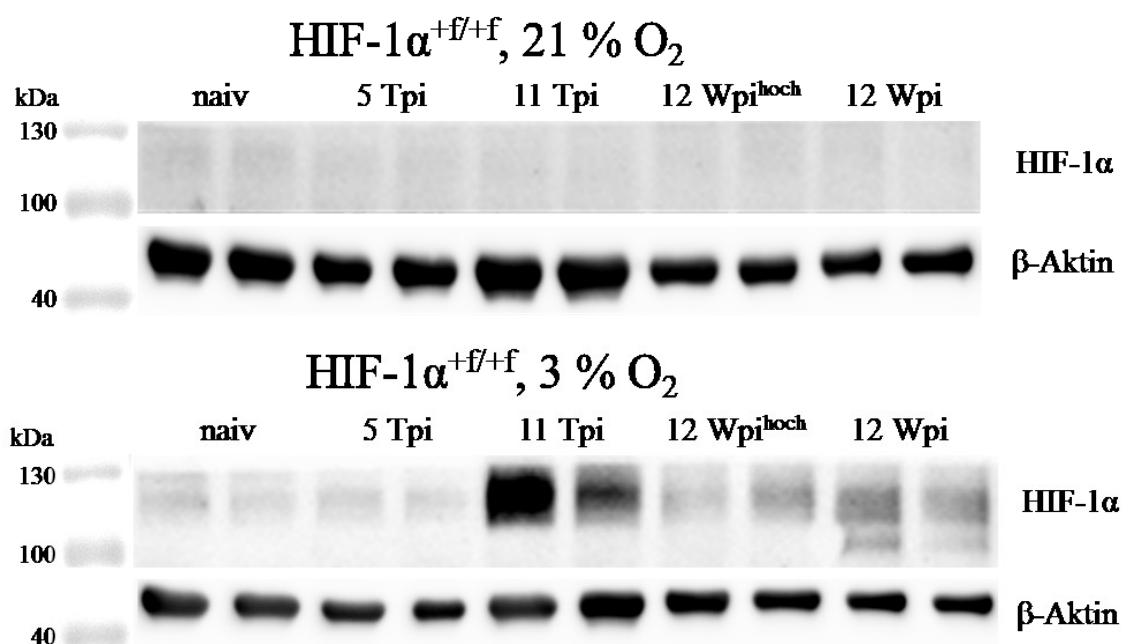


Abb. 4.22: Verstärkte HIF-1 α Proteinakkumulation 11 Tage *post infectionem* unter Hypoxie in dendritischen Zellen aus HIF-1 $\alpha^{f/f}$ Mäusen

Unter normoxischen Bedingungen konnte nur eine geringe Menge an HIF-1 α Protein nachgewiesen werden. Bei 3 % O_2 erfolgte die höchste Induktion des HIF-1 α Proteins 11 Tpi. Auch 12 Wpi und 12 Wpi^{hoch} war die HIF-1 α Proteinakkumulation im Vergleich zur naiven hypoxischen Kontrolle erhöht. Es wurden 50 μg Gesamtzelllysate aufgetragen.

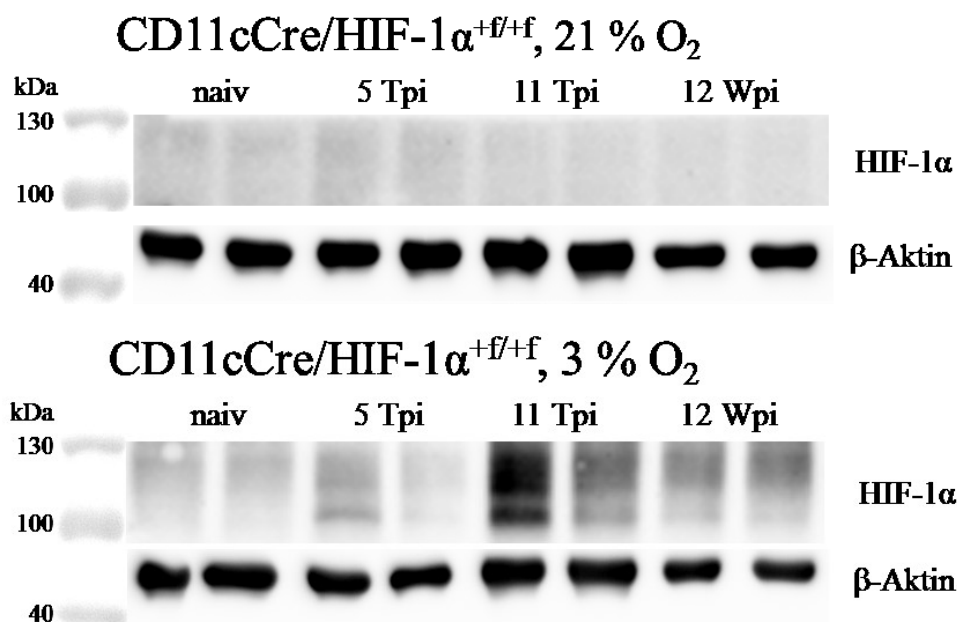


Abb. 4.23: Verstärkte HIF-1 α Proteinakkumulation 11 Tage *post infectionem* unter Hypoxie in dendritischen Zellen aus CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{f/f}$ Mäusen

Unter normoxischen Bedingungen konnte nur eine geringe Menge an verkürztem HIF-1 α Protein nachgewiesen werden. Bei 3 % O_2 erfolgte die höchste Induktion des HIF-1 α Proteins 11 Tpi. Auch 12 Wpi war die HIF-1 α Proteinakkumulation im Vergleich zur naiven hypoxischen Kontrolle erhöht. Es wurden 50 μg Gesamtzelllysate aufgetragen.

4.5.2 Induktion der HIF-1 Zielgenexpression in dendritischen Zellen während der frühen Phase der akuten Infektion

Neben seiner Rolle als Hauptregulator der Sauerstoffhomöostase induziert das HIF-System auch die Genexpression vieler Enzyme der Glykolyse. Für die Charakterisierung der HIF-1 Zielgenexpression wurden daher Zielgene aus beiden Gebieten ausgewählt. So hat Adrenomedullin (ADM) unter anderem vasodilatatorische Eigenschaften, was bei der Regulation der Sauerstoffversorgung eine Rolle spielt, und der Glukose-Transporter-1 (Glut-1) ist ein Schlüsselenzym des Glukosemetabolismus (Sitkovsky & Lukashev 2005).

Nach 5 Tagen Infektion konnte unter Normoxie sowohl bei den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ als auch bei den CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen eine leichte Induktion der ADM mRNA Expression nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf von später akuter und chronischer Infektion sank die mRNA Expression des HIF-1 Zielgens ADM jedoch um mehr als die Hälfte (s. Abb. 4.24, A). Unter hypoxischen Bedingungen konnte in den BmDCs aus den naiven Mäusen keine Veränderung der Genexpression detektiert werden. Während jedoch die ADM mRNA Expression in den dendritischen Zellen der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen 5 Tage nach Infektion nur leicht erhöht war, war diese in den BmDCs der CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse signifikant erhöht. Wie auch unter normoxischen Bedingungen war die Induktion der ADM mRNA zu den späteren Zeitpunkten der Infektion unter Hypoxie in allen Tieren im Vergleich zur naiven Kontrolle vermindert (s. Abb. 4.24, B).

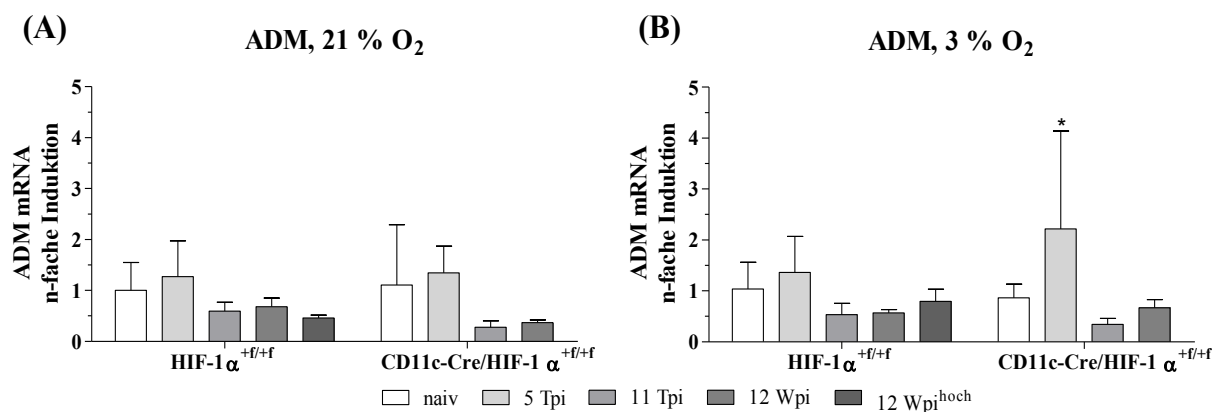


Abb. 4.24: Erhöhte Induktion der ADM mRNA Expression in der frühen Phase der akuten FV Infektion

Die Analyse der Genexpression in dendritischen Zellen aus dem Knochenmark naiver und FV-infizierter Mäuse erfolgte mittels Echtzeit-PCR. Alle Werte wurden auf den Mittelwert der naiven HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse als Kontrolle bezogen. Die Expression der ADM mRNA war unter hypoxischen Bedingungen 5 Tpi bei den CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen signifikant erhöht. Die Induktion der ADM mRNA zu den späteren Infektionszeitpunkten war in allen Tieren sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen vermindert (Mittelwerte \pm SD; naiv n=10, 5 Tpi n=8, 11 Tpi n=6, HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi n=7, HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi^{hoch} n=5, CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi n=9).

Unter Normoxie konnten keine Unterschiede in der Glut-1 mRNA Expression in den BmDCs der HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse im Verlauf der Virusinfektion festgestellt werden. Dahingegen war die Induktion der Glut-1 mRNA Expression in den BmDCs der CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse 5 Tage nach Infektion signifikant erhöht. Im weiteren Verlauf von später akuter zu chronischer FV Infektion war die Glut-1 mRNA Expression gegenüber den BmDCs aus naiven und 5 Tage infizierten CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen leicht vermindert (s. Abb. 4.25, A). Hypoxie resultierte bei den HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen in einer generellen Induktion der Glut-1 mRNA Expression, jedoch konnten auch hier keine Unterschiede im Verlauf der Infektion detektiert werden. Bei den CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen führten die hypoxischen Bedingungen nur in den BmDCs aus naiven Mäusen zu einer erhöhten Glut-1 mRNA Expression, während die Genexpression nach FV Infektion im Vergleich zur hypoxischen Kontrolle reduziert war (s. Abb. 4.25, B).

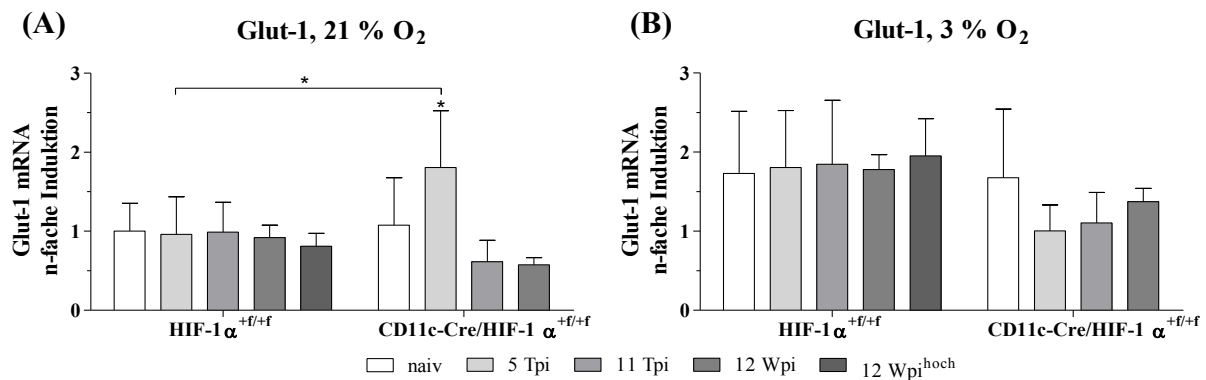


Abb. 4.25: Reduzierte Glut-1 mRNA Expression unter Hypoxie nach FV Infektion von CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen

Die Analyse der Genexpression in dendritischen Zellen aus dem Knochenmark naiver und FV-infizierter Mäuse erfolgte mittels Echtzeit-PCR. Die Induktion der Glut-1 mRNA war unter normoxischen Bedingungen 5 Tpi in den CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen signifikant erhöht. Bei 3% O₂ erfolgte eine generelle Induktion der Glut-1 mRNA bei HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen, während die Genexpression bei den CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen nach FV Infektion reduziert war (Mittelwerte \pm SD; naiv n=10, 5 Tpi n=8, 11 Tpi n=6, HIF-1 α ^{+f/+f} 12 Wpi n=7, HIF-1 α ^{+f/+f} 12 Wpi^{hoch} n=5, CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} 12 Wpi n=9).

4.5.3 Reduzierte MHC I und MHC II mRNA Expression nach Maximum in früher akuter Phase der Infektion

Zur näheren Charakterisierung der dendritischen Zellen nach FV Infektion wurde auch die Expression der MHC-Komplexe analysiert. Obwohl MHC I sich auf der Zelloberfläche aller kernhaltigen Zellen befindet, spielt es zudem eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen. MHC II hingegen wird nur auf der Zelloberfläche der antigen-präsentierenden Zellen exprimiert, welche T-Helferzellen Fremdpeptide präsentieren (Kaufmann 2009).

Nach 5 Tagen Infektion war die Expression der MHC I mRNA in den dendritischen Zellen der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse signifikant erhöht, während diese bei den CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen nur tendenziell zunahm. Im weiteren Verlauf der akuten und chronischen FV Infektion nahm die MHC I Expression kontinuierlich ab und war nach 12 Wochen im Vergleich zu naiven Kontrolle auf mRNA Ebene um die Hälfte reduziert (s. Abb. 4.26, A). Unter hypoxischen Bedingungen war die MHC I mRNA Expression in BmDCs naiver Tiere gegenüber den BmDCs unter normoxischen Bedingungen um etwa 50 % erhöht. Zu Beginn der akuten Virusinfektion stieg die Expression der MHC I mRNA sowohl in den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ als auch den CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen an Tag 5 zuerst an und nahm im weiteren Verlauf der Infektion kontinuierlich ab (s. Abb. 4.26, B).

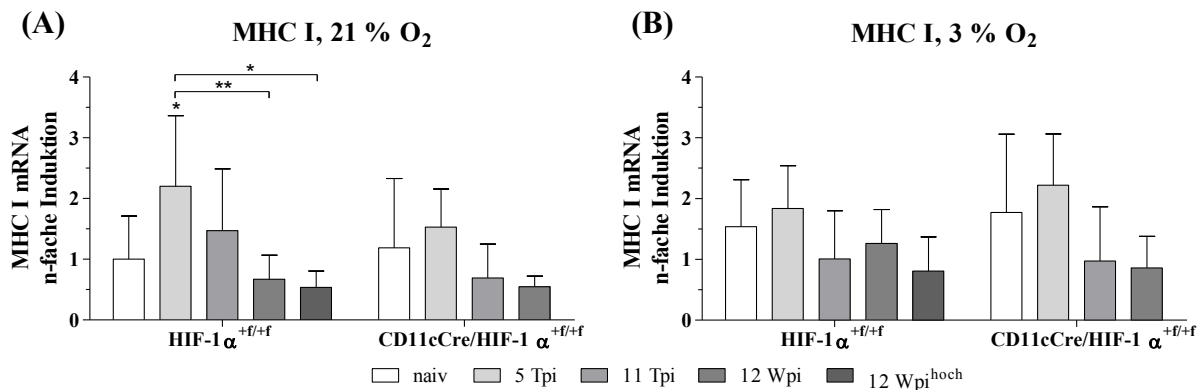


Abb. 4.26: Reduzierte MHC I mRNA Expression nach Maximum an Tag 5 nach Infektion

Die Analyse der Genexpression in dendritischen Zellen aus dem Knochenmark naiver und FV-infizierter Mäuse erfolgte mittels Echtzeit-PCR. Alle Werte wurden auf den Mittelwert der naiven HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse als Kontrolle bezogen. Die akute FV Infektion resultierte in allen BmDCs sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie in einer erhöhten MHC I mRNA Expression 5 Tpi, welche in den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen bei 21 % O₂ signifikant erhöht war. Im weiteren Verlauf nahm die MHC I mRNA Expression wieder ab (Mittelwerte \pm SD; naiv n=10, 5 Tpi n=8, 11 Tpi n=6, HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi n=7, HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi^{hoch} n=5, CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi n=9).

Auch bei MHC II mRNA konnte 5 Tage nach Infektion eine in der Tendenz erhöhte Expression detektiert werden. Dies war in den BmDCs aus den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen stärker ausgeprägt als in den BmDCs der CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse. Im weiteren Verlauf der Infektion nahm die MHC II mRNA Expression von 5 Tage bis 12 Wochen nach Infektion in den BmDCs der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Tiere signifikant ab und war zum Schluss bei allen Tieren gegenüber den naiven Kontrollen vermindert. Es konnten keine Unterschiede in der MHC II mRNA Expression der dendritischen Zellen zwischen Normoxie und Hypoxie festgestellt werden (s. Abb. 4.27).

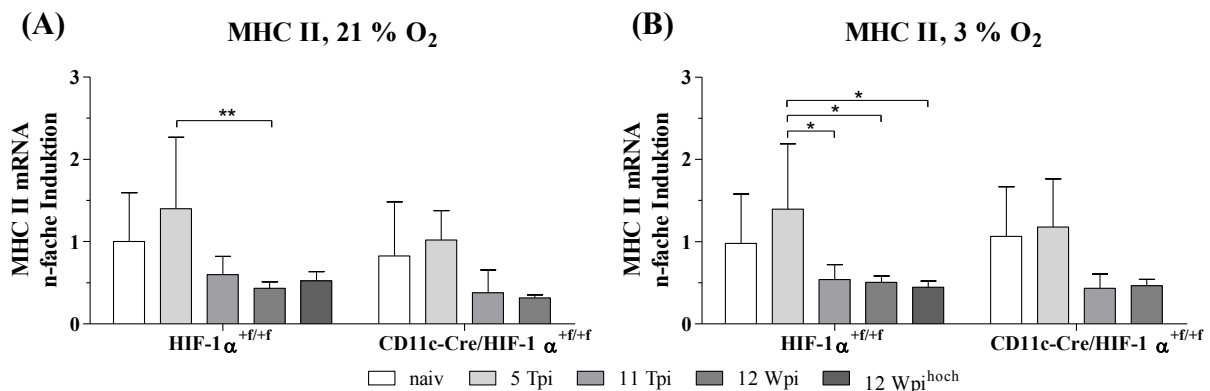


Abb. 4.27: Reduzierte MHC II mRNA Expression nach Maximum 5 Tpi

Die Analyse der Genexpression in dendritischen Zellen aus dem Knochenmark naiver und FV-infizierter Mäuse erfolgte mittels Echtzeit-PCR. Alle Werte wurden auf den Mittelwert der naiven HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse als Kontrolle bezogen. Die MHC II Expression in den BmDCs war 5 Tpi tendenziell erhöht und nahm im weiteren Verlauf der Infektion deutlich ab (Mittelwerte \pm SD; naiv n=10, 5 Tpi n=8, 11 Tpi n=6, HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi n=7, HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi^{hoch} n=5, CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi n=9).

4.5.4 Hypoxie in dendritischen Zellen führt zu einer ausgeprägten Induktion der TLR7 mRNA-Expression nach akuter FV Infektion

Toll-like Rezeptoren (TLR) spielen als Teil des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle bei der Erkennung von pathogen-assoziierten molekularen Mustern. Die verschiedenen TLRs reagieren auf unterschiedliche Liganden, so erkennt der TLR7 einzelsträngige virale RNA (Borden et al. 2007), wie sie im FV vorkommt.

Bei 21 % O₂ führte die FV Infektion in den dendritischen Zellen nach 5 Tagen Infektion zu einer gesteigerten TLR7 mRNA Expression, welche in den BmDCs der CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse signifikant ausgeprägt war. Im weiteren Verlauf von akuter zu chronischer FV Infektion nahm die Expression der TLR7 mRNA in den BmDCs der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse stetig ab. Von Tag 5 zu Tag 11 nahm die Genexpression in den BmDCs der CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse signifikant um gut Dreiviertel ab und stieg 12 Wochen nach Infektion wieder auf den Ausgangswert an (s. Abb. 4.28, A). Unter hypoxischen Bedingungen war die TLR7 mRNA Expression in den BmDCs aus naiven Mäusen um etwa 20 % vermindert, stieg aber 5 Tage nach Infektion sowohl in den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ als auch den CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen signifikant auf das Vierfache. Anschließend sank die TLR7 Expression wieder auf die Expressionsstärke naiver Tiere ab, war jedoch in den BmDCs aus HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen mit hoher Viruslast 12 Wochen nach Infektion erneut leicht erhöht (s. Abb. 4.28, B).

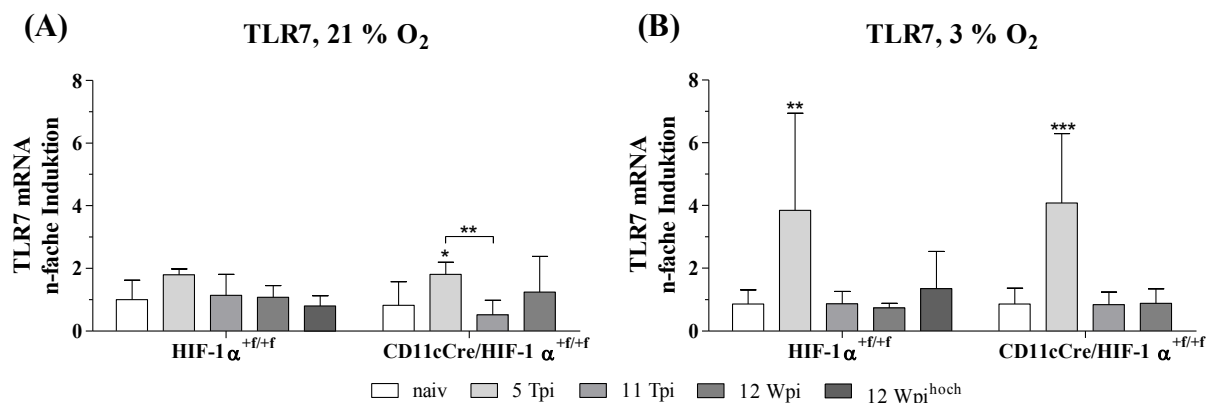


Abb. 4.28: Deutlicher Anstieg der TLR7 mRNA Expression unter Hypoxie 5 Tpi

Die Analyse der Genexpression in dendritischen Zellen aus dem Knochenmark naiver und FV-infizierter Mäuse erfolgte mittels Echtzeit-PCR. Alle Werte wurden auf den Mittelwert der naiven HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse als Kontrolle bezogen. Die Expression der TLR7 mRNA war bei 3 % O₂ sowohl in den BmDCs von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ als auch den CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen 5 Tpi signifikant erhöht. Auch unter Normoxie erfolgte eine Induktion der TLR7 mRNA, welche weniger ausgeprägt war (Mittelwerte \pm SD; naiv n=10, 5 Tpi n=8, 11 Tpi n=6, HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi n=7, HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi^{hoch} n=5, CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ 12 Wpi n=9).

4.6 Chronische FV Infektion in CD4Cre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen

Während bei den HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen nach chronischer FV Infektion einige der Mäuse eine Splenomegalie mit erhöhter Viruslast hatten, konnte dieser Effekt bei keiner der für 12 Wochen infizierten CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäuse beobachtet werden (s. Abschnitte 4.2.2 und 4.2.1). Um nachzuweisen, dass der beobachtete Effekt durch den HIF-1 α Knock-out in den CD11c⁺ dendritischen Zellen bedingt ist, haben wir Mäuse mit einem Knock-out in den CD4⁺ T-Zellen für 12 Wochen mit dem Friend Virus infiziert.

4.6.1 Ähnliche Entwicklung in Milzgewicht und Viruslast bei HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ und CD4Cre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen nach chronischer FV Infektion

Die Milzen von naiven und chronisch infizierten Tieren wurden direkt nach der Organentnahme gewogen. Mittels einer definierten Anzahl eingesetzter Milzzellen aus den infizierten Tieren wurden für jedes Individuum der infizierten Zellen in der Milz mittels IC-Assay bestimmt.

Sowohl bei den HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ als auch bei den CD4Cre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen konnte nach chronischer Infektion zwischen Mäusen mit normalen Milzgewicht und Splenomegalie unterschieden werden. Während das Milzgewicht in den naiven Mäusen bei durchschnittlich 0,07 g lag, hatte die Hälfte der chronisch infizierten Tiere ein Milzgewicht von etwa 0,09 g. Dabei konnten nur geringe Unterschiede zwischen HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ und CD4Cre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen detektiert werden. Die andere Hälfte der Kontroll- und der Knock-out-Mäuse entwickelte eine massive Splenomegalie. Während die Milzen der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäuse durchschnittlich 0,454 g wogen, waren die Milzen der CD4Cre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäuse mit 0,585 g etwa 30 % schwerer (s. Abb. 4.29).

Nach 12 Wochen Infektion konnten in der Hälfte der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen noch durchschnittlich 22 infizierte Zellen pro Millionen Zellen nachgewiesen werden, während in der Hälfte der CD4Cre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen im Mittel nur 3 infizierte Zellen pro Millionen Zellen detektierbar waren. In den Tieren mit Splenomegalie hingegen konnte noch eine deutlich erhöhte Viruslast nachgewiesen werden. Während in den HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen mit Splenomegalie im Mittel 2673 Zellen pro Millionen Zellen infiziert waren, war die durchschnittliche Zahl der infizierten Zellen pro Millionen Zellen mit 5491 Zellen in den CD4Cre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen etwa doppelt so hoch (s. Abb. 4.30).

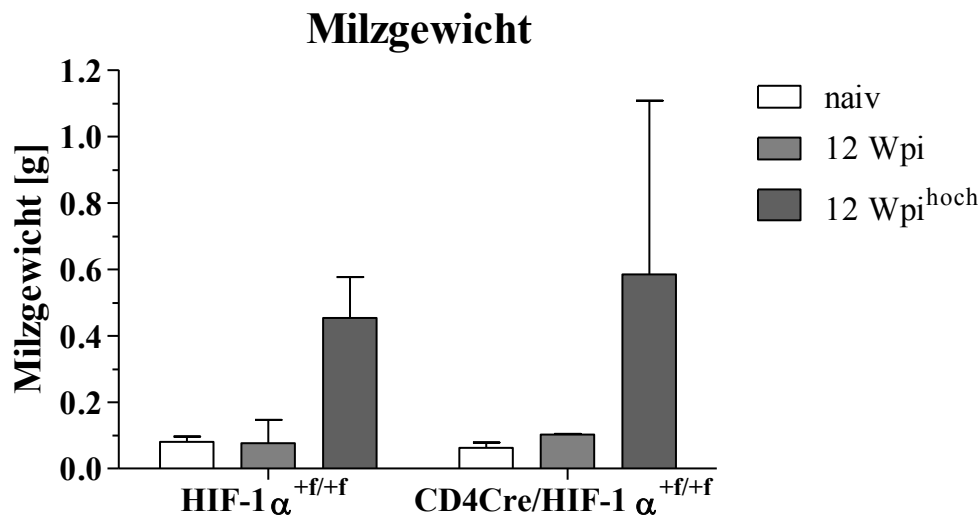


Abb. 4.29: Chronische FV Infektion resultiert in erhöhter Splenomegalie bei einem Teil der HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$ und CD4Cre/HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$ Mäuse

Das Milzgewicht von naiven und FV-infizierten HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$ und CD4Cre/HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$ Mäusen wurde direkt nach der Organentnahme bestimmt. Nach chronischer FV Infektion waren die Milzen bei der Hälfte der Mäuse deutlich vergrößert. Das Milzgewicht der CD4Cre/HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$ Mäuse war im Vergleich zu den HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$ Mäusen mit hoher Viruslast tendenziell höher (Mittelwerte \pm SD; n=3).

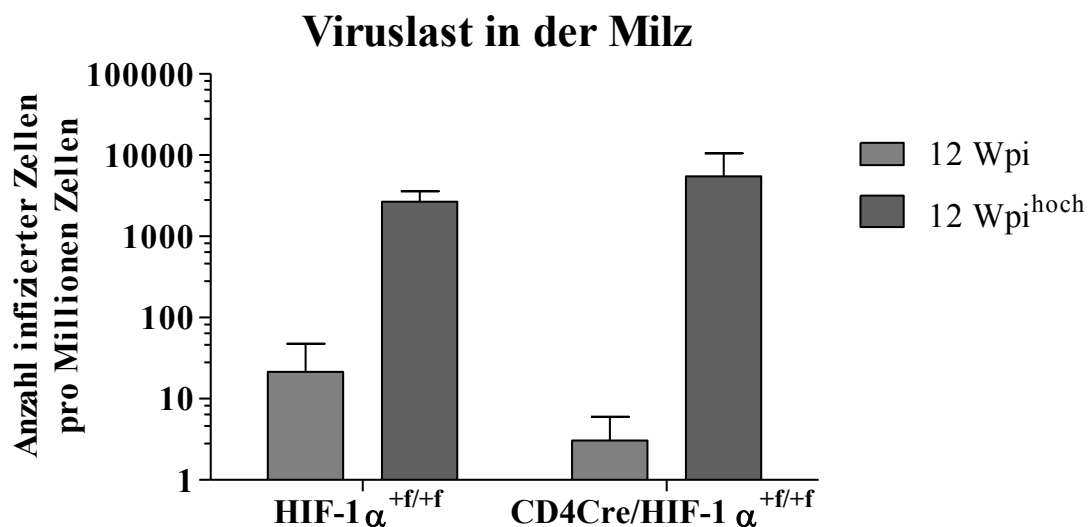


Abb. 4.30: Chronische FV Infektion führt zu einer erhöhten Viruslast bei der Hälfte der HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$ und CD4Cre/HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$ Mäusen

Mit den Milzzellen FV-infizierter Mäuse wurde für jedes Individuum ein IC-Assay durchgeführt. Während in der Hälfte der HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$ und CD4Cre/HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$ Mäuse nur noch geringe Mengen an Virus nachzuweisen waren, war die Viruslast bei der anderen Hälfte der chronisch infizierten Mäuse deutlich erhöht. Dabei war die Zahl der infizierten Zellen in den CD4Cre/HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$ Tieren mit hoher Viruslast größer als in den HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$ Tieren (Mittelwerte \pm SD; n=3).

4.6.2 Hohe Viruslast führt zu einer Verdopplung der myeloischen Suppressorzellen in chronisch infizierten Mäusen

Durch die Markierung der Oberflächenmarker $CD11b^+$ $Gr1^+$ wurden die myeloischen Suppressorzellen in der Milz angefärbt, um eventuelle Veränderungen in dieser Population nachweisen zu können.

Sowohl in den $HIF-1\alpha^{+/+}$ als auch den $CD4Cre/HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen blieben die $CD11b^+$ $Gr1^+$ MDSCs mit etwa 1,4 % der lebenden Milzzellen in den naiven und den FV-infizierten Tieren mit geringer Viruslast konstant. In den chronisch infizierten Mäusen mit hoher Viruslast stieg die Zahl der $CD11b^+$ $Gr1^+$ MDSCs auf etwa 3 % der lebenden Milzzellen um etwa das Doppelte an. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen $HIF-1\alpha^{+/+}$ und $CD4Cre/HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen festgestellt werden (s. Abb. 4.31).

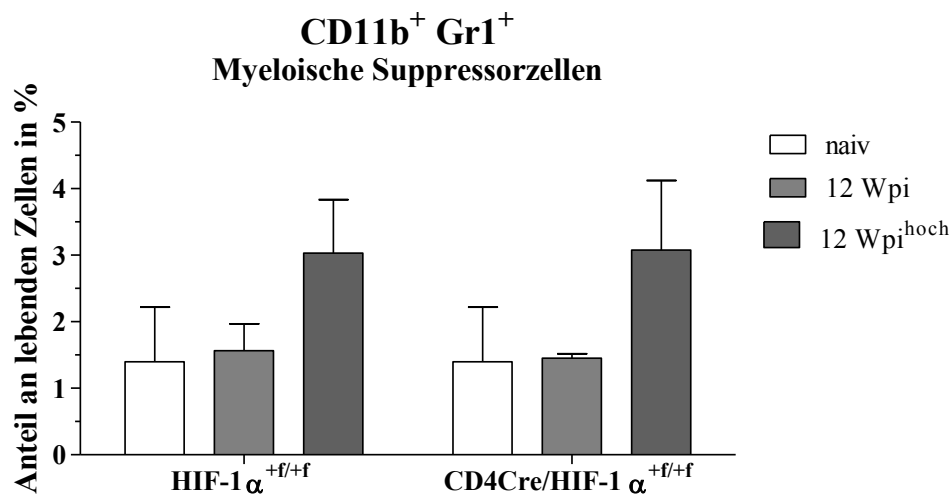


Abb. 4.31: Erhöhte Anzahl der myeloischen Suppressorzellen in chronischer infizierten Mäusen mit hoher Viruslast

Zur Charakterisierung der Zellen in der Milz wurden diese mittels spezifischer Antikörper markiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Myeloische Suppressorzellen (MDSC) der Maus werden als $CD11b^+$ $Gr1^+$ Zellen beschrieben. Die Zahl der MDSCs verändert sich in den Mäusen mit geringer Viruslast gegenüber den naiven Tieren nicht, während sich deren Anzahl in den Mäusen mit hoher Viruslast verdoppelt (Mittelwerte \pm SD; n=3).

5 Diskussion

5.1 Einfluss akuter und chronischer FV Infektion auf das Immunsystem von HIF-1 α ^{+f/+f} und CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse

Die Infektion mit dem Friend Retrovirus führt in suszeptiblen Mäusen innerhalb von zwei Wochen zu einer chronischen Virämie, Polyzythämie und massiven Splenomegalie, welche sich innerhalb der folgenden ein bis zwei Monate zu einer malignen, letalen Erythroleukämie entwickelt (Halemano et al. 2013). Der FV-resistente C57Bl/6 Stamm hingegen ist in der Lage die FV-induzierte Splenomegalie zu limitieren und sich innerhalb von zwei Wochen von der Infektion zu erholen. Jedoch bleiben die Tiere ein Leben lang persistierend infiziert (Hoatlin & Kabat 1995). Für die Infektion der HIF-1 α ^{+f/+f} und CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse mit C57Bl/6-Hintergrund wurden daher unterschiedliche Infektionszeitpunkte gewählt. Die Infektionsdauer betrug 5 Tage für die frühe und 11 Tage für die späte Akutinfektion mit 2×10^5 SFFU je Maus, zugleich wurde für die chronische FV Infektion ein Zeitraum von 12 Wochen mit 4×10^5 SFFU je Maus gewählt (Zelinskyy et al. 2009; Hasenkrug et al. 1998).

Die akute FV Infektion führte zu einer im Mittel ähnlichen Zunahme des Milzgewichtes von Kontroll- und Knock-out Mäusen, hierbei ergaben sich jedoch gleichzeitig Unterschiede in der Anzahl der Erythrozyten und der Viruslast nach früher Akutinfektion. Dabei waren die Veränderungen in der Erythrozytenzahl, dem Milzgewicht und der Viruslast in den HIF-1 α ^{+f/+f} Tieren mit den von infizierten Wildtyp C57Bl/6 Mäusen im Verlauf von früher und später Akutinfektion vergleichbar (Zelinskyy et al. 2009). Während nach 5 Tagen Infektion die Erythrozytenzahl in den Milzen der HIF-1 α ^{+f/+f} Tiere gegenüber den CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Tieren erhöht war, resultierte die frühe Akutinfektion in den Tieren mit konditionellem Knock-out in einer signifikant erhöhten Viruslast. Diese Unterschiede egalisierten sich jedoch in der späten Akutinfektion, bei welcher beide Parameter annähernd übereinstimmten. Obwohl die Knock-out-Mäuse zunächst eine signifikant höhere Anzahl an infizierten Zellen in der Milz zeigten, waren sie ebenso wie die Kontrolltiere in der Lage die Viruslast signifikant zu reduzieren. So schienen sowohl Kontroll- als auch Knock-out-Tiere in der Lage innerhalb von 11 Tagen die Virusinfektion zu kontrollieren und einzudämmen, so wie es bei Wildtyp C57Bl/6 Mäusen beobachtet werden kann. Wenngleich in der akuten Phase der Infektion keine Unterschiede in Form und Gewicht festzustellen waren, führte die Infektion zu gravierenden Veränderungen in der Struktur der HIF-1 α ^{+f/+f} Milzen. Gleichzeitig blieben die Milzstruktur und der Anteil der Lymphfollikel nach akuter FV Infektion bei den Milzen der CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse erhalten. Die vermehrte Invasion der Erythrozytenvorläuferzellen in die Milz von HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen resultierte in einem partiellen Verlust der

Milzstruktur, bei der die Fläche der Lymphfollikel in den Milzen 5 Tage nach Infektion um mehr als der Hälfte reduziert wurde. Obwohl die Kontrolltiere in der Lage waren die Virusinfektion nach 11 Tagen einzudämmen und die Zahl der Erythrozyten zu reduzieren, waren die strukturellen Veränderungen der Milz noch deutlich zu erkennen und damit offensichtlich zu groß um sich innerhalb dieses Zeitraums zu regenerieren. Ähnliche strukturelle Veränderungen sind in den Milzen von C57Bl/6 Mäusen nach einer späten Akutinfektion nicht nachweisbar (Browne 2011), während diese in suszeptiblen Balb/c Mäusen zu einem vollständigen Verlust der Milzstruktur führt (Hegde et al. 2009). Der Verlust von Lymphfollikeln und Keimzentren ist auch für andere akute Retrovirusinfektionen beschrieben. So ist eine akute HIV-1 Infektion in der Regel von der Zerstörung der Keimzentren begleitet, was vor allem in der Mukosa beobachtet werden kann (Santiago et al. 2011). Dies dient dazu die Aktivierung und Reifung der B-Zellen durch die $CD4^+$ T-Helferzellen zu unterbinden und damit die Immunantwort gegen das Virus einzuschränken.

Vergleicht man die Ergebnisse, die in der chronischen Phase der Infektion erhoben wurden, werden hier deutliche Unterschiede zwischen $HIF-1\alpha^{+f/+f}$ und $CD11cCre/HIF-1\alpha^{+f/+f}$ Mäusen ersichtlich. Die chronisch infizierten $CD11cCre/HIF-1\alpha^{+f/+f}$ Mäuse bildeten eine homogene Gruppe, innerhalb derer sich das Milzgewicht und die Erythrozytenzahl normalisierten und die Viruslast auf ein Minimum zurückging. Dies entspricht der Verteilung für chronisch infizierte Wildtyp C57Bl/6 Tiere, welche nach 12 Wochen Infektion ebenfalls eine homogene Gruppe mit geringer Viruslast bilden (Zelinskyy et al. 2006; Hasenkrug et al. 1998). Innerhalb der Gruppe der $HIF-1\alpha^{+f/+f}$ Mäuse hingegen konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden. Während die eine Hälfte der Kontrollmäuse sich ebenso wie die Knock-out Mäuse vollständig von der Virusinfektion erholt hatte, entwickelte die andere Hälfte der $HIF-1\alpha^{+f/+f}$ Tiere eine rezidivierende FV Infektion. Diese führte zu einer massiven Splenomegalie, einer signifikant erhöhten Anzahl von Erythrozyten und Erythrozytenvorläuferzellen, sowie einer stark erhöhten Viruslast. Während die Milzstruktur der $HIF-1\alpha^{+f/+f}$ Mäuse mit der geringen Viruslast sich wieder vollständig regeneriert hatte, führte die massive Invasion der Erythrozyten und Erythrozytenvorläuferzellen und die damit verbundene Zunahme der Milzmasse in den $HIF-1\alpha^{+f/+f}$ Mäusen mit hoher Viruslast zu einem vollständigen Verlust der Milzstruktur und der Lymphfollikel. Dieser Phänotyp wurde bisher vor allem nach der FV Infektion der suszeptiblen Balb/c Mäuse gezeigt, bei welchen die Splenomegalie und der Strukturverlust bereits innerhalb von 14 Tagen auftreten (Hegde et al. 2009).

Zu Beginn einer Virusinfektion wird der allgemeine Schutz des Organismus in erster Linie durch das angeborene Immunsystem vermittelt. Vor allem die antigenpräsentierenden Zellen

wie DCs, Makrophagen oder Monozyten, sind durch die Prozessierung und Präsentation von Pathogenen an ihrer Zelloberfläche maßgeblich daran beteiligt die Zellen des adaptiven Immunsystems zu aktivieren und zu stimulieren. Die Immunantwort von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ und CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen war im Verlauf der akuten FV Infektion ähnlich ausgeprägt und hatte vielfältige Einflüsse auf die Entwicklung der einzelnen Immunzellpopulationen. Der leichte Anstieg des NK-Zellanteils während der frühen Akutinfektion schien im Zusammenhang mit dem Anstieg der Viruslast zu stehen, da die Anzahl der NK-Zellen bereits in der späten Phase der Infektion wieder abnahm. Dies lässt vermuten, dass die NK-Zellantwort in der Milz durch das FV vor allem in der frühen Phase der akuten Infektion induziert werden kann. Eine Stütze für diese These ist, dass die FV Infektion von Erythroblasten innerhalb weniger Tage zur Überexpression des Oberflächenproteins RAE-1 (engl. *mRNA export factor 1*) führt. Die Bindung von RAE-1 an ist den NK-Zellrezeptor NKG2D (engl. *natural killer group 2D*) führt zur Aktivierung der NK-Zellen (Ogawa et al. 2011), welche in der Freisetzung Apoptose induzierender zytotoxischer Substanzen und immunmodulatorischer proinflammatorischer Zytokine resultiert (Slavuljica et al. 2011). Gleichzeitig führte die frühe Akutinfektion zu einem Anstieg der Makrophagenpopulation und deren Aktivierung (Anstieg des Oberflächenmarkers CD86, s. Abb. 4.11, C), welche in den CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen deutlich stärker ausgeprägt war als in den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäusen. Die proportional zur Viruslast zu- und abnehmende Makrophagenpopulation während der akuten FV Infektion kann zu der Annahme verleiten, dass diese in direktem Zusammenhang mit der verminderten Viruslast steht. Jedoch gehören Makrophagen, wie alle myeloischen Zellen, zu den Zielzellen des Friend Virus (Marcelletti & Furmanski 1979). Die infizierten Makrophagen sind bereits kurz nach der Infektion in der Lage Viren freizusetzen und sind in ihrer Pino- und Phagozytoseaktivität eingeschränkt. Die FV Infektion reduziert die MHC II Expression auf den Makrophagen, deren veränderte Antigen-Präsentation in einer verminderten Aktivierung der Zellen des adaptiven Immunsystems resultiert (Toniolo et al. 1980; Jones et al. 1992). Ohne eine gleichzeitige Induktion der MHC II Oberflächenexpression nach der Virusinfektion führt der beobachtete Anstieg des Aktivierungsmarkers CD86 nicht zu einer immunologisch wirksamen Aktivierung der Makrophagen (Mosser 2003). Trotz der erhöhten Anzahl aktivierter Makrophagen wurden diese durch die verminderte Expression von MHC II in ihrer Funktion als Aktivatoren des adaptiven Immunsystems inhibiert (Gordon 2003).

Im Gegensatz zu der Makrophagenpopulation stieg die Zahl der DCs nur leicht an, ging jedoch zugleich mit einem kontinuierlichen Anstieg der MHC I Expression und Aktivierung im Verlauf der akuten FV Infektion einher. Bei der späten Akutinfektion kam es gleichzeitig zur maximalen Aktivierung und hohen MHC I Expression der DCs sowie zu einer

Aktivierung der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen. Dies scheint ebenso in einem direkten Zusammenhang zu stehen wie die parallel erfolgende Limitierung der Virusreplikation. Um die Zusammenhänge zwischen DC und CTL Aktivierung nachvollziehen zu können, muss zuerst das adaptive Immunsystem näher betrachtet werden. Während der frühen Akutinfektion war vor allem die Abnahme an CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ CTLs auffallend. Eine ähnliche Verteilung der T-Zellpopulation konnte bereits nach der Infektion von C57Bl/6 Mäusen in der Bachelorarbeit gezeigt werden, so dass dieser Effekt für die akute FV Infektion nicht ungewöhnlich ist. Eine mögliche Erklärung ist der hohe Anteil an Erythrozyten in der Milz, welche sich aus den gleichen hämatopoietischen Stammzellen entwickeln (Weissman 2002). Dabei hatte die frühe Akutinfektion jedoch keinen Einfluss auf den Anteil an CD19⁺ B-Zellen in der Milz. Im Verlauf zur späten Akutinfektion erholten sich die Populationen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wieder, gleichzeitig führte die Infektion aber zu einer deutlichen Reduktion der B-Zellen in den HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ und CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen. Die verminderte Anzahl an B-Zellen korrelierte direkt mit der Abnahme der Viruslast und ist der Tatsache geschuldet, dass B-Zellen ebenso wie Erythroblasten und myeloische Zellen direkt durch das FV-infiziert werden können (Dittmer et al. 2002). Die Infektion der B-Zellen findet bereits zu Beginn der Infektion statt, betrifft jedoch nicht die T-Zellen, welche weder akut noch persistierend infiziert werden (Hasenkrug et al. 1998). Wenngleich die Anzahl der infizierten B-Zellen nur einen kleinen Teil der gesamten infizierten Zellen ausmacht, führt die Reduktion der Viruslast gleichzeitig zur Elimination der infizierten B-Zellen und zur Abnahme der B-Zellpopulation.

Da in der Literatur vor allem die Aktivität der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen als maßgeblich für die Erholung und Verminderung der Viruslast nach einer akuten FV Infektion beschrieben wird (Robertson et al. 1992), wurde zusätzlich zu der Analyse der einzelnen Immunzellpopulationen auch die Aktivierung der CD8⁺ CTLs genauer betrachtet. In der frühen Akutinfektion konnte nur ein leichter Anstieg des Oberflächenmarkers CD69 festgestellt werden, welcher sehr schnell nach der T-Zellaktivierung hochreguliert wird und der früheste Marker der Lymphozytenaktivierung ist (Alari-Pahissa et al. 2012). Während der späten Akutinfektion erfolgt gleichzeitig mit einer reduzierten Expression von CD69 ein signifikanter Anstieg der Aktivierungsmarker CD43 und CD278 in den Kontroll- und in den Knock-out-Tieren. Die gegensätzliche Regulation der unterschiedlichen Marker ist neben der Aktivierung ebenfalls ein Kennzeichen für die Reife der T-Zellen. So spricht die erhöhte Expression von CD69 kurz nach dem Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen zwar für eine erfolgreiche Aktivierung der T-Zellen, jedoch nicht für deren Fähigkeit auszureifen und zu migrieren (Alari-Pahissa et al. 2012). Erst die rasche Reduktion der CD69 Oberflächenexpression nach

Entfernen des T-Zellrezeptor-Stimulus führt dazu, dass die CTLs weiter ausreifen und in der Lage sind aus den sekundären lymphatischen Organen in andere Gewebe auszuwandern (Zhang & Bevan 2010). Die gesteigerte Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen führte gleichzeitig zu einem signifikanten Anstieg an aktivierten degranulierenden und aktivierten Granzym B synthetisierenden CTLs. Hierbei konnten deutlich mehr für die Serinprotease Granzym B positive CD8⁺ CTLs in den Milzen der CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse nachgewiesen werden. Die Ausschüttung von Granzym B ist zusammen mit Perforin wesentlich für die durch CTLs induzierte Apoptose ihrer Zielzellen verantwortlich. Durch die durch Polyperforin gebildete Pore gelangt Granzym B in die Zelle und kann dort Kaspase abhängig oder unabhängig die Apoptose der Zielzelle auslösen (Lord et al. 2003). Sofern die Degranulierung der CTLs nicht gestört ist, kann die höhere Anzahl an Granzym B synthetisierenden CD8⁺ T-Zellen in den Milzen der CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Tiere zu einer schnelleren und effektiveren Abtötung virus-infizierter Zellen führen. Eine wahrscheinliche Ursache für die stärkere Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen während der späten Akutinfektion könnte die gesteigerte Aktivierung und MHC I Expression der dendritischen Zellen sein, da CD8⁺ zytotoxische T-Zellen Pathogene über den von den DCs präsentierten Peptid-MHC Klasse I-Komplex erkennen (Banchereau & Steinman 1998). Eine akute Virusinfektion führt zur Reifung und Aktivierung der DCs, welche in direkter Konsequenz CD8⁺ T-Zellen aktivieren können. Jedoch kann im weiteren Verlauf einer Infektion zwischen Aktivierung und Reifung von DCs unterschieden werden, welche unterschiedliche Einflüsse auf T-Zellen ausüben. Während ruhende oder beständig reife DCs die Toleranz gegenüber einer Infektion induzieren können, sind aktivierte reife DCs in der Lage die Immunität gegen einen Erreger zu vermitteln (Tan & O'Neill 2005). So ist es zum einen möglich, dass die CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse keine rezidivierende Infektion entwickeln, da sie das Virus während der Akutinfektion effizienter eingedämmt haben. Auf der anderen Seite könnte die HIF-1 α Defizienz in den dendritischen Zellen zu einer verminderten Anzahl ruhender oder beständig reifer DCs führen, so dass die Knock-out Mäuse eine Immunität und keine Toleranz gegenüber dem Virus entwickeln.

Für die Verminderung der Viruslast durch die Elimination infizierter Zellen während der akuten FV Infektion sind in der Hauptsache die Zellen des adaptiven Immunsystems verantwortlich. Dabei spielt vor allem die zytotoxische Aktivität der CD8⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle. Durch die Depletion von CD8⁺ T-Helferzellen werden resistente Mäuse suszeptibel für die FV Infektion, was bereits bei akuter FV Infektion zu einer erhöhten Viruslast führt (Dittmer et al. 2002). Die Depletion von CD4⁺ T-Helferzellen verhindert hingegen erst in einem Zeitraum von 1-3 Wochen die Limitierung der Virusinfektion, welche durch die

fehlende Aufrechterhaltung der CD8⁺ T-Zell- und neutralisierenden Antikörperantwort verursacht wird (Nair et al. 2010).

Während die Immunreaktion bei der akuten FV Infektion bei den Tieren ähnlich ausgeprägt war, konnten aufgrund der rezidivierenden Infektion bei der Hälfte der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Tiere gravierende Unterschiede in der Verteilung der Immunzellpopulationen nach 12 Wochen aufgezeigt werden. In allen Knock-out-Tieren und bei der Hälfte der Kontrolltiere waren nur noch wenige infizierte Zellen nachweisbar. Auch hatte sich die Verteilung der Zellen des erworbenen Immunsystems vollständig normalisiert und war mit denen der naiven Mäuse vergleichbar. Die chronisch rezidivierende Infektion der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäuse führte hingegen zu einem deutlichen Anstieg der myeloischen Zellen, welche durch die signifikant erhöhte Anzahl von dendritischen Zellen und Granulozyten verursacht wurde. Da der Umfang der Makrophagenpopulation gegenüber der Akutinfektion sich nicht verändert hatte, war deren Einfluss auf die Expansion der myeloischen Zellpopulation vernachlässigbar gering. Die virusinduzierte Proliferation der dendritischen Zellen war zwar von einer fortwährenden Zunahme der MHC I Expression auf den DCs begleitet, jedoch blieb die für die Reifung der DCs notwendige Aktivierung durch die fehlende Expression kostimulatorischer Moleküle erkennbar aus (Tan & O'Neill 2005). Insgesamt scheint die vermehrte Anzahl von Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten weniger einer verstärkten Immunreaktion, als ihrer Funktion als Zielzellen des Friend Virus während der rezidivierenden Infektion zuzuschreiben zu sein (Dittmer et al. 2002; Toniolo et al. 1980). Diese Annahme könnte dadurch unterstützt werden, dass gleichzeitig die Zahl der NK-Zellen nicht beeinflusst wurde, welche im Gegensatz zu vielen anderen Immunzellen nicht als Zielzellen des FV beschrieben sind. Jedoch kann eine erhöhte MHC I Expression der DCs durchaus mit einer Immunevasion der NK-Zellantwort im Zusammenhang stehen. Um eine Präsentation viraler Antigene zu reduzieren und somit der T-Zellantwort zu entkommen, sind manche Viren in der Lage die MHC I Expression auf ihren Zielzellen zu vermindern (Gainey et al. 2012). Auf der anderen Seite erkennen NK-Zellen allerdings über den MHC I-Komplex körpereigene Zellen, so dass das fehlende inhibitorische Signal bei verminderter Expression von MHC I zur Elimination der infizierten Zellen führt. Über HLA-A und -B Moleküle (engl. *human leukocyte antigen*), dem humanen Synonym für den MHC-Komplex, werden den zytotoxischen T-Zellen die Viruspeptide präsentiert, während HLA-C und -E Moleküle als inhibitorische Liganden für die NK-Zellrezeptoren dienen. Um solche Immunreaktionen zu vermeiden haben persistierend infizierende Viren wie HIV Mechanismen entwickelt die inhibitorischen HLA-C und -E Moleküle induzieren, während gleichzeitig die Expression der die T-Zellantwort

stimulierenden HLA-A und B Moleküle inhibiert wird. Dies führt dazu, dass diese Viren wohl der Immunantwort durch NK-Zellen als auch durch T-Zellen entkommen (Kane & Golovkina 2010). Wenngleich diese Art der Immunevasion durch das FV bisher nicht beschrieben wurde, sind auch murine Viren wie das murine Cytomegalievirus (MCMV) in der Lage über den MHC I Komplex die Infektion zu ihren Gunsten zu beeinflussen. MCMV kodiert für drei virale Proteine, welche nachweislich die Antigenpräsentation beeinflussen können. Dabei verhindern zwei dieser Proteine, dass der Peptid-MHC I-Komplex in die Zellmembran gelangt um das virale Antigen zu präsentieren, während das Dritte einen Komplex mit dem MHC I Molekül bildet und dessen Oberflächenexpression sowohl induziert als auch über mehrere Stunden stabilisiert (Doom & Hill 2008; Wagner et al. 2002).

Während die Lymphozytenpopulation sich in den chronisch infizierten Kontroll- und Knock-out-Mäusen normalisiert hatte, resultierte die rezidivierende Infektion in den $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ Mäusen im Kontrast zu den Zellen des erworbenen Immunsystems in einer Suppression des adaptiven Immunsystems. Obwohl die Anzahl der CD8^+ CTLs in der Milz abnahm, führte die rezidivierende Infektion zu einer gesteigerten Aktivierung, Degranulierung und Granzym B Synthese der T-Zellen. Die Aktivität der CTLs der chronisch infizierten $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ und $\text{CD11cCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ Mäuse mit geringer Viruslast unterschied sich hingegen nicht von der in naiven Mäusen. Während die CD8^+ T-Zellantwort wie bereits beschrieben maßgeblich für die erfolgreiche Erholung in der akuten Phase der FV Infektion verantwortlich ist, ist die chronische, persistierende FV Infektion in Wildtyp C57Bl/6 Mäusen vor allem durch eine eingeschränkte CD8^+ T-Zellantwort gekennzeichnet (Zelinskyy et al. 2005). Dabei wird die im Verlauf der 12wöchigen persistierenden Virusinfektion auftretende Dysfunktion der CD8^+ CTL durch den virusinduzierten Anstieg der regulatorischen T-Zellpopulation verursacht. Deren Anzahl stieg gegenüber den naiven C57Bl/6 Mäusen um etwa das Zwei- bis Dreifache an und führte zu einer reduzierten CD8^+ CTL-Aktivierung (Zelinskyy et al. 2006). Nach der chronischen Infektion von $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ und $\text{CD11cCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ Mäusen konnten jedoch keine Unterschiede in der Gesamtzahl der regulatorischen T-Zellen in den Milzen naiver und infizierter Mäuse festgestellt werden. Zwar war der Anteil an regulatorischen T-Zellen an der CD4^+ T-Zellpopulation in den rezidivierend infizierten $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ Mäusen viermal so hoch wie in den naiven Tieren, jedoch wirkte sich dies nicht auf die Gesamtzahl dieser Zellen aus. Der supprimierende Effekt der CD4^+ regulatorischen T-Zellen ist normalerweise mit einer Reduktion der Effektoraktivität der CD8^+ CTLs verbunden, welche durch eine verminderte Aktivierung und zytotoxische Aktivität gekennzeichnet ist (Kapp et al. 2006). Dem widerspricht allerdings die erhöhte Aktivierung, Degranulation und Synthese von Granzym B der CD8^+ CTLs nach chronisch rezidivierender Infektion der $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ Mäuse. Zudem

erklärt dies auch nicht die gegenüber den naiven Tieren signifikant reduzierte Anzahl an CD4⁺ T-Helfer-, CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen.

Myeloische Suppressorzellen (MDSC) hingegen sind generell in der Lage die Immunantwort und auch die Anzahl sowohl von T-Zellen als auch von B-Zellen zu supprimieren (Green et al. 2013). Während die Anzahl der MDSCs sich im Verlauf der FV Infektion in den HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ und CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen nicht veränderte, stieg deren Zahl in den chronisch rezidivierend infizierten HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Tieren signifikant an. Der signifikante Anstieg an MDSCs verhält sich umgekehrt proportional zur Lymphozytenpopulation und könnte damit eine Ursache für die Immunsuppression sowie die rezidivierende FV Infektion sein. Pathologische Bedingungen wie eine Pockenvirusinfektion können die Differenzierung von myeloischen Vorläuferzellen und unreifen myeloischen Zellen zu reifen myeloischen Zellen verhindern und die Proliferation der MDSC Population begünstigen (Gabrilovich & Nagaraj 2009). So können unter anderem die HIF-1 Zielgene VEGF und die Cyclooxygenase 2 (COX2) die Expansion der MDSCs induzieren (Gabrilovich et al. 1998; Fujita et al. 2011; Kaidi et al. 2006). Die für die Aktivierung der MDSCs benötigten Faktoren wie IFN- γ , IL-4, IL-13 und TGF- β werden hauptsächlich durch in diesem Fall virusaktivierte T-Zellen synthetisiert (Gabrilovich & Nagaraj 2009). Die dadurch induzierten immunmodulatorischen Funktionen der aktivierten MDSCs haben unter anderem die Depletion von Nährstoffen, die von Lymphozyten benötigt werden, zur Folge. Außerdem kann die Bildung reaktiver Stickstoffspezies zur Nitrierung und damit zur Desensibilisierung des T-Zellrezeptors führen, was nachfolgend die Interaktion mit dem Peptid-MHC Komplex und damit die Immunantwort verhindert (Gabrilovich et al. 2012). Auch die Immunfunktion von dendritischen Zellen kann durch MDSCs beeinträchtigt werden. So sind diese in der Lage DCs an der Aufnahme von Antigenen zu hindern und deren Migrations- und T-Zell-aktivierende Fähigkeiten zu inhibieren (Goh et al. 2013). Während die myeloischen Suppressorzellen im Verlauf einer akuten Virusinfektion scheinbar keine wesentliche Rolle spielen, können chronische Infektionen in einer Expansion der MDSC Population resultieren. So führt nur die Infektion von Mäusen mit einem chronischen lymphozytären Choriomeningitisvirus (LCMV) Stamm zu einer erhöhten Anzahl von MDSC, welche die virusspezifische T-Zellantwort inhibieren (Norris et al. 2013). Auch die Immunsuppression während der chronischen HIV-1 Infektion steht im direkten Zusammenhang mit der Expansion myeloischer Suppressorzellen und begünstigt damit Sekundärinfektionen und AIDS (Qin et al. 2013; Vollbrecht et al. 2012; Garg & Spector 2013).

Insgesamt scheint vor allem die signifikant erhöhte Anzahl an MDSCs in den chronisch infizierten HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen für die rezidivierende FV Infektion und die verminderte

Anzahl an Lymphozyten verantwortlich zu sein. Gleichzeitig spielt aber auch der genetische Hintergrund der Tiere eine wichtige Rolle für den Ausgang einer Infektion. So können schon geringe genetische Polymorphismen zwischen C57Bl/6 Mäusen aus den Zuchten von Charles River, Harlan oder Taconic zu signifikanten Unterschieden in den Ergebnissen führen (Bryant et al. 2008). Diese Daten werden dadurch unterstützt, dass sich die CTL-Antwort der Wildtyp C57Bl/6 Mäuse (Harlan Zucht) aus der Arbeitsgruppe für Virologie in Essen während der chronischen FV Infektion wesentlich anders verhielt als die der hier untersuchten HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Tiere von Charles River (Zelinsky et al. 2005). Um den Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die chronische Infektion der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäuse ausschließen zu können, wurden auch CD4Cre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäuse mit Charles River Hintergrund für 12 Wochen mit dem FV infiziert. Während jedoch keine der chronisch infizierten CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäuse eine erhöhte Viruslast aufwies, führte die chronische Infektion der CD4Cre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäuse zu einem ähnlichen Phänotyp wie bei den chronisch infizierten HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Tieren. Sowohl die Hälfte der Kontrolltiere als auch die Hälfte der Mäuse mit einem CD4⁺/CD8⁺ spezifischen HIF-1 α Knock-out bildete eine Splenomegalie mit einer deutlich erhöhten Viruslast aus. Zudem verdoppelte sich in allen Tieren mit hoher Viruslast die Zahl der MDSCs. Zwar ist die Ursache für die erhöhte Anzahl an MDSCs, welche augenscheinlich die verminderte Immunantwort auslöst, aus den vorliegenden Daten noch nicht ersichtlich, dennoch scheint ein funktionelles HIF-1 in den dendritischen Zellen für deren Entwicklung zwingend erforderlich zu sein. Für die funktionelle Aktivität der MDSC spielt HIF-1 α als Transkriptionsfaktor eine entscheidende Rolle und wird in diesen Zellen vermehrt exprimiert. Die Inhibierung von HIF-1 α resultiert in direkter Konsequenz in einer reduzierten Entwicklung und inhibitorischen Funktion der MDSCs (Lechner et al. 2011; Corzo et al. 2010). Die Expansion der myeloischen Vorläuferzellen durch das FV und die inhibitorische Wirkung der MDSCs auf das Immunsystem begünstigt sicherlich die rezidivierende FV Infektion, erklärt allerdings nicht warum diese nur bei der Hälfte der Tiere auftritt. Wenngleich MDSCs sich in der Maus nicht aus CD11c⁺ DC-Vorläuferzellen entwickeln, scheint ein funktionelles HIF-1 α in CD11c⁺ Zellen auch für die Entstehung von MDSCs unabdinglich zu sein. Dieses scheint vor allem den Tieren mit einem Knock-out von HIF-1 α in den dendritischen Zellen einen immunologischen Vorteil zu verschaffen, der in weiterführenden Versuchen näher geklärt werden muss. Obwohl die Viruslast in der Milz akut infizierter CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Tiere anfangs höher als in den Kontrollmäusen war, waren alle chronisch infizierten Knock-out-Mäuse in der Lage sich vollständig von der Infektion zu erholen.

5.2 *In vitro* Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen aus FV-infizierten Mäusen

Dendritische Zellen sind ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems und interagieren selbst in Abwesenheit von Pathogenen beständig mit T-Zellen. Im gesunden Organismus sind DCs unter anderem am Erhalt der Selbsttoleranz von T-Zellen sowohl im Thymus als auch in der Peripherie beteiligt, wenngleich ihre Rolle dabei noch näher erforscht werden muss (Lewis & Reizis 2012). Besser untersucht hingegen ist die Beteiligung der DCs an der Aktivierung von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen nach der Infektion mit Viren oder Bakterien. So kommt es kurz nach der Infektion zu einer raschen Anreicherung von DCs und naiven CD8⁺ T-Zellen in der peripheren Region der Lymphknoten, wo der von den DCs präsentierte Peptidantigen-MHC I-Komplex zur spezifischen Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen führt. Die ersten wenige Minuten andauernden Kontakte zwischen DCs und CD8⁺ CTLs waren bereits nach 6 Stunden nachweisbar, jedoch konnte die maximale Interaktion mit einer Dauer von mehr als 9 Minuten erst nach 18 Stunden erfasst werden. Weitere 36 bis 48 Stunden nach der ersten Interaktion mit den DCs erfolgte die Expression von Aktivierungsmarkern durch die CD8⁺ CTLs (Hickman et al. 2008; John et al. 2009). Bei der Analyse der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen in der Milz konnte eine vermehrte Aktivierung nach akuter FV Infektion sowie nach chronischer, rezidivierender FV Infektion nachgewiesen werden. Zumindest *in vivo* schien der konditionelle HIF-1 α Knock-out in den CD11c⁺ dendritischen Zellen keinen wesentlichen Einfluss auf die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen zu haben. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere antigenpräsentierende Zellen wie Monozyten oder Makrophagen eine möglicherweise eingeschränkte Aktivierung durch DCs mit einem HIF-1 α Knock-out kompensieren. Daher wurde zusätzlich die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen durch aus dem Knochenmark differenzierte dendritische Zellen *in vitro* untersucht. Wenngleich die DCs aus infizierten Tieren *in vitro* kultiviert wurden, konnte eine erhöhte Expression von FV mRNA in den Zellen nachgewiesen werden, welche sich proportional zur Viruslast des entsprechenden Tiers verhielt. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die Differenzierung zu einem Verlust des Virus und zu unspezifischen Effekten bei der Aktivierung der T-Zellen führt. Obwohl sowohl die Viruslast in den infizierten Mäusen als auch die Expression der FV mRNA in den DCs nach 5 Tagen Infektion am höchsten war, wurde dieser Zeitpunkt aufgrund der fehlenden T-Zellaktivierung *in vivo* im Aktivierungsassay nicht weiter untersucht.

Die Kokultur mit DCs führte generell zu einer Induktion des frühen Aktivierungsmarkers CD69, welcher nach erfolgreichem Kontakt zwischen dendritischer Zelle und CD8⁺ T-Zelle

vermehrt exprimiert wird (Alari-Pahissa et al. 2012). Nach Akutinfektion (11 Tage) waren sowohl die dendritischen Zellen aus HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen als auch aus CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen in der Lage bei CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen die Aktivierung und Reifung zu induzieren, welche gleichzeitig mit einer Reduktion von CD69 einherging. Zwar waren die DCs aus den rezidivierend infizierten HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen in der Lage mit den CD8⁺ T-Zellen zu interagieren, jedoch konnten sie ebenso wenig wie die DCs aus den chronisch infizierten Kontroll- und Knock-out-Tieren mit geringer Viruslast die CD43 Expression auf den CD8⁺ CTLs induzieren. Darüber hinaus führten nur DCs aus akut infizierten Mäusen HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen zu einer leichten Zunahme der aktivierten CD278⁺ T-Zellen, während DCs aus infizierten CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen die CD278 Expression auf den CD8⁺ T-Zellen nicht erhöhen konnten. Das induzierbare kostimulatorische Molekül (engl. *inducible costimulatory molecule*, ICOS) CD278 reguliert unter anderem die Synthese von IL-4, den Klassenwechsel von B-Zellen und die Bildung von Keimzentren (Rudd & Schneider 2003). Da ICOS jedoch eine größere Bedeutung für die Aktivität von T-Helferzellen als von zytotoxischen T-Zellen hat, ist die Relevanz dieser Beobachtung für die akute FV Infektion fraglich. Während die Blockierung von ICOS die T-Helferzellantwort auf LCMV limitiert, sind CD8⁺ T-Zellen in ihrer Funktion davon nicht beeinträchtigt (Kopf et al. 2000). Im Zuge der Aktivierung wurde die Degranulation (gemessen durch die Expression von CD107a auf der Zelloberfläche) und Granzym B Synthese in den CD8⁺ CTLs durch DCs aus akut infizierten CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen stärker induziert als durch DCs aus akut infizierten HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen. Jedoch resultierte weder die Kokultur mit DCs aus chronisch infizierten Kontroll- noch aus Knock-out-Mäusen unabhängig von der Viruslast in einer erhöhten Anzahl an aktivierten degranulierenden bzw. aktivierten Granzym B positiven CD8⁺ T-Zellen.

Die *in vivo* beobachtete erhöhte Aktivierung und zytotoxische Aktivität der CD8⁺ T-Zellen nach akuter FV Infektion konnte auch *in vitro* nach Kokultur mit DCs aus akut infizierten Mäusen induziert werden. Dabei waren dendritische Zellen mit HIF-1 α Knock-out jedoch in der Lage die Degranulation und Granzym B Synthese der CD8⁺ T-Zellen stärker anzuregen als DCs mit funktionellem HIF-1 α . Für die schnelle Erholung nach einer akuten FV Infektion ist diese starke Virus-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort essentiell, da sie hauptverantwortlich für die Kontrolle und Eindämmung des Virus ist (Robertson et al. 1992). Für die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen spielt dabei nicht nur die Präsentation aufgenommener Viruspartikel eine Rolle, sondern sie wird auch durch FV-infizierte DCs induziert. Das in der Oberfläche des FV enthaltene Fragment des C3-Komplementfaktors steigert zwar die Infektion von DCs, wirkt jedoch gleichzeitig auch als natürliches Adjuvans für eine verstärkte DC-vermittelte Virus-spezifische CD8⁺ T-Zellaktivierung (Bánki et al. 2010). So sind DCs trotz ihrer Funktion als

Zielzellen der FV Infektion dazu in der Lage die Aktivierung der CD8⁺ CTLs zumindest im Verlauf der akuten FV Infektion stark zu induzieren, trotzdem scheinen sie keinen Anteil an der erhöhten Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen in den chronisch rezidivierend infizierten HIF-1 α ^{+f/+f} Tieren zu haben. Denn obwohl *in vivo* eine erhöhte Aktivierung und zytotoxische Aktivität der CD8⁺ T-Zellen in diesen Tieren in der Milz nachgewiesen werden konnte, führte die Kokultur mit dendritischen Zellen zu keinen Veränderungen im Aktivierungsstatus der CTLs. Dieser Effekt kann dadurch bedingt sein, dass die persistierende FV Infektion von dendritischen Zellen die Reifung dieser Zellen einschränkt und zu einer verminderten Expression kostimulatorischer Moleküle führt. Auch könnte die BmDC-Kultur der chronisch rezidivierend infizierten Tiere mit MDSCs verunreinigt sein, welche die T-Zellaktivierung nachweislich hemmen können. *In vitro* werden MDSC ebenfalls mit GM-CSF jedoch ohne IL-4 aus Knochenmarkszellen differenziert (Rössner et al. 2005). Zwar enthält die BmDC-Kultur mehr in der Regel mehr als 60 bis 70 % dendritische Zellen, jedoch liegt auch immer eine Kontamination mit Makrophagen vor, so dass auch eine Verunreinigung mit MDSCs nicht ausgeschlossen werden kann (Hüsecken 2010). Obwohl die infizierten DCs immer noch in der Lage sind naive CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren, führt dies nicht zu einer antigen-spezifischen T-Zellproliferation (Balkow et al. 2007). Neben der Antigenpräsentation durch den Peptid-MHC I-Komplex der DCs werden zusätzliche kostimulatorische Moleküle für die Aktivierung naiver CD8⁺ T-Zellen benötigt. So führt unter anderem die Bindung der Liganden CD80 oder CD86 an den auf naiven T-Zellen konstitutiv exprimierten Rezeptor CD28 zu Aktivierung kostimulatorischer Signalwege, welche für die T-Zellantwort und Proliferation unabdinglich sind. Fehlen diese kostimulatorischen Signale führt dies zur Anergie und zum Zelltod der mit dem Antigen in Kontakt gekommenen naiven T-Zellen (Sugamura et al. 2004). Während die rezidivierende Infektion der HIF-1 α ^{+f/+f} Tiere zwar zu einer erhöhten Expression von MHC I führte, war die Expression des Aktivierungsmarkers CD86 auf den dendritischen Zellen vermindert, so dass ein wesentlicher Faktor für eine erfolgreiche Aktivierung naiver T-Zellen fehlte.

5.3 Auswirkung der FV Infektion auf die HIF-1 α Proteinakkumulation und die Genexpression in den dendritischen Zellen

Entzündungen und Verletzungen im Gewebe sind stets von geringen Konzentrationen an Sauerstoff und Glukose begleitet, während die Konzentrationen inflammatorischer Zytokine, Lactat sowie reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies deutlich erhöht sind (Cramer et al. 2003). Zudem führen auch bakterielle und virale Infektionen zu dynamischen Veränderungen der HIF-1 α Expression. Der Kontakt von Makrophagen oder dendritischen Zellen mit

bakteriellen Stimuli resultiert zwar in einer erhöhten Expression von HIF-1 α mRNA und Protein, jedoch sind einige Bakterien in der Lage dies zu ihren Gunsten zu beeinflussen. So ist das *Chlamydia pneumoniae* während seiner intrazellulären Replikation in der Lage durch die Sekretion von CPAF (engl. *chlamydial protease-like activity factor*) den Abbau des akkumulierten HIF-1 α Proteins zu induzieren und so die HIF-1 induzierten Immunantworten zu umgehen (Zinkernagel et al. 2007). Auch Viren sind dazu in der Lage die Expression von HIF-1 α zu ihren Gunsten zu beeinflussen, so erhöht das Respiratorische-Synzytial-Virus (RSV) durch die Induktion von HIF-1 die Bildung von VEGF. Die dadurch verursachte erhöhte Permeabilität des Lungenepithels erleichtert die Infektion und Verbreitung von RSV (Kilani et al. 2004). Gleichzeitig ist die erhöhte Expression von HIF-1 α nach viraler Infektion wichtig für die antivirale Immunantwort, welche unter anderem durch erhöhte Interferon Typ I Produktion unterstützt wird, aber auch für Limitierung von Zellschäden nach einer Virusinfektion (Wobben et al. 2013; Zinkernagel et al. 2007). Um zu bestimmen welchen Einfluss die FV Infektion auf die Genexpression in CD11c⁺ dendritischen Zellen mit einem HIF-1 α Knock-out hat, wurden aus dem Knochenmark differenzierte dendritische Zellen verwendet. Da sich die FV mRNA Expression in den DCs proportional zur Viruslast in den Milzen der infizierten Tiere veränderte, waren damit die Einflüsse der Virusinfektion auch *in vitro* nachweisbar.

So führte die frühe Akutinfektion zu einer erhöhten HIF-1 α mRNA Expression in den dendritischen Zellen aus HIF-1 α ^{+f/+f} und CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen, welche unter Hypoxie deutlich stärker ausgeprägt war. Gleichsam nahm die HIF-1 α Expression im weiteren Verlauf der Infektion ab und korrelierte somit zumindest in der akuten Phase mit der Viruslast und Expression der FV mRNA. Während die frühe Akutinfektion nicht zu einem Anstieg in der HIF-1 α Proteinexpression führte, resultierte die späte Akutinfektion in einer starken Anreicherung des HIF-1 α Proteins in den dendritischen Zellen nach der Inkubation bei 3 % O₂, welche in den DCs aus den HIF-1 α ^{+f/+f} und CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen gleich stark induziert war. Dabei setzte sich die Proteinbande bei den infizierten CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse sowohl aus dem durch den Verlust des Exon 2 verkürzten und nicht funktionellen HIF-1 α Proteins als auch aus dem vollständigen, funktionellen HIF-1 α Protein zusammen. Letzteres ist aufgrund der generellen Makrophagenkontamination in der dendritischen Zellkultur und des nicht vollständigen HIF-1 α Knock-outs in den dendritischen Zellen auch in den Knock-out-Tieren nachweisbar. Im weiteren Verlauf zur chronischen Infektion nahm die Proteinakkumulation von HIF-1 α in allen Tieren zwar ab, war gegenüber naiven und 5 Tage infizierten Mäusen jedoch weiterhin erhöht. Auch in den chronisch rezidivierend infizierten HIF-1 α ^{+f/+f} Tiere konnte weder ein erneuter Anstieg der HIF-1 α

mRNA Expression noch eine deutlich erhöhte HIF-1 α Proteinexpression nachgewiesen werden. Vor allem die akute FV Infektion scheint einen direkten Einfluss sowohl auf die mRNA Expression als auch auf die Proteinakkumulation von HIF-1 α zu haben. Während gleichzeitig mit der erhöhten FV mRNA Expression in der frühen akuten Phase der Infektion die HIF-1 α mRNA Expression induziert wird, fällt die verstärkte HIF-1 α Proteinakkumulation mit einer deutlichen Reduktion der Viruslast zusammen. Wenngleich die Viruslast in den Milzen der infizierten Mäuse nach 11 Tagen abgenommen hat, war die FV mRNA Expression in den DCs vergleichsweise noch deutlich erhöht. Die intrazellulär vorliegende FV mRNA könnte dabei in den DCs einen verminderten Proteinabbau oder eine von der Menge an mRNA unabhängige Synthese von HIF-1 α induzieren. So führt auch das latente Membranprotein 1 (LMP1) des Epstein-Barr Virus zu einer erhöhten HIF-1 α Proteinkonzentration. Dabei induziert LMP1 weder die HIF-1 α mRNA Expression noch inhibiert es den Abbau des Proteins, stattdessen führt es zu einer erhöhten Synthese des HIF-1 α Proteins durch die Induktion von Wasserstoffperoxid und die Beteiligung des p42/p44 MAPK Signalweges (Wakisaka et al. 2004). Die Induktion des HIF-1 α Proteins erfolgt in den DCs *in vitro* während der späten akuten FV Infektion und fällt damit zeitlich zusammen sowohl mit der maximalen Aktivierung der DCs als auch der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen *in vivo*. Die Stabilisierung von HIF-1 α unter hypoxischen Bedingungen kann in den dendritischen Zellen zur Reifung und der vermehrten Expression von Oberflächenproteinen führen, zu denen auch kostimulatorische Moleküle wie CD80 oder CD86 gehören (Maltzman & Haase 2008). In Verbindung mit der Antigenpräsentation durch MHC I sind diese kostimulatorischen Moleküle dazu in der Lage die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen erfolgreich zu aktivieren und eine FV-spezifische T-Zellantwort zu induzieren (Balkow et al. 2007). Folglich scheint die *in vitro* beobachtete erhöhte HIF-1 α Proteinakkumulation in den DCs aus Mäusen nach später Akutinfektion unter Hypoxie im direkten Zusammenhang mit der Aktivierung der DCs und CD8⁺ T-Zellen *in vivo* zu stehen. Die DCs wurden *in vitro* unter ähnlichen Sauerstoffbedingungen wie in den sekundären lymphatischen Organen hypoxisch inkubiert, so dass wahrscheinlich auch *in vivo* die HIF-1 α Proteinexpression in den DCs erhöht war. Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen reifen und aktivierten DCs zwischen HIF-1 α ^{+f/+f} und CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen *in vivo* nachgewiesen werden. Demnach mussten auch HIF-1 unabhängige Faktoren wesentlich an der erhöhten Aktivierung der DCs beteiligt sein, welche die nachfolgende Aktivierung und zytotoxische Aktivität der CD8⁺ T-Zellen und Limitierung der Virusinfektion induzierten.

Zwar konnte eine generelle Induzierbarkeit des HIF-1 Zielgens Glut-1 in den DCs der HIF-1 α ^{+f/+f} Mäuse unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen werden, jedoch führten

weder die akute noch die chronische FV Infektion zu Änderungen in der Genexpression. Nur die frühe Akutinfektion von CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen resultierte unter Normoxie in einer erhöhten Expression von Glut-1 in den DCs, während eine generell erhöhte Expression des HIF-1 Zielgens ADM in der frühen Akutphase der Infektion nachgewiesen werden konnte. Sowohl die erhöhte Glut-1 Expression als auch die erhöhte ADM Expression bei den CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen kann mit der maximalen Expression der FV mRNA in Zusammenhang gebracht werden. Wenngleich HIV-1 infizierte humane T-Zellen in der Lage sind die Glut-1 Expression zu induzieren, wurde diese Induktion bei einer für lymphatische Organe physiologischen Sauerstoffkonzentration von 2-5 % beschrieben (Loisel-Meyer et al. 2012). Jedoch war die Expression von Glut-1 in den untersuchten BmDCs bei 3 % O₂ vermindert, so dass eine mögliche durch das FV induzierte Glut-1 Expression bei Normoxie unter hypoxischen Bedingungen inhibiert wird. Auch die erhöhte ADM Expression scheint im Zusammenhang mit der hohen Viruslast an Tag 5 nach Infektion zu stehen. Die signifikant erhöhte Expression von ADM in den DCs mit einem HIF-1 α Knock-out unter Hypoxie erscheint jedoch widersprüchlich, da es sich bei ADM um eines der HIF-1 Zielgene handelt. Dennoch kann ADM auch HIF-1 unabhängig z.B. durch das Prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α}), welches vor allem in der glatten Muskulatur, den Atemwegen, den Augen und dem Uterus vorkommt, unter Hypoxie induziert werden (Maybin et al. 2011). PGF_{2 α} ist zudem in der Lage die Replikation der Friend Erythroleukämie Zellen, einer *in vitro* Zelllinie aus FV-infizierten Mäusen, zu stimulieren (Santoro et al. 1979). Dendritische Zellen sind zwar in der Lage Prostaglandine zu synthetisieren, jedoch handelt es sich dabei um PGD₂ und PGE₂ und nicht um das PGF_{2 α} . Allerdings kann PGD₂ unter anderem weiter zu PGF_{2 α} 9 α ,11 β -PGF₂, einem Stereoisomer von PGF_{2 α} , verstoffwechselt werden (Ricciotti & FitzGerald 2011). So könnte das PGF_{2 α} Stereoisomer eventuell ebenfalls dazu in der Lage sein die ADM Expression unabhängig von HIF-1 α zu stimulieren. Jedoch setzt dies voraus, dass sich die PGF_{2 α} -Spiegel in den BmDCs von Kontroll- und Knock-out-Mäusen zu diesem Infektionszeitpunkt unterscheiden. Ebenso kann aus den vorliegenden Zielgenanalysen keine eindeutige Aussage über die funktionelle Konsequenz der Deletion im dendritischen HIF-1 α auf die Genexpression getroffen werden, vielleicht auch deshalb, weil eventuell kontaminierende Makrophagen mit funktioneller HIF Expression hier wesentliche Effekte überdecken könnten. Um den direkten Einfluss der HIF-1 Proteinakkumulation nach der Virusinfektion nachweisen zu können, müssten in weiteren Versuchen sowohl der PGF_{2 α} -Spiegel als auch die Expression anderer HIF-1 Zielgene untersucht werden.

Neben der Expression von HIF-1 α und HIF-1 Zielgenen wurde auch die Genexpression von für die Immunantwort essentiellen Faktoren untersucht. So ist die Präsentation von Antigenen

durch die MHC-Komplexe für eine effektive Immunerkennung von wesentlicher Bedeutung. An der Zelloberfläche kernhaltiger Zellen präsentieren MHC I-Komplexe vor allem körpereigene Antigene, welche die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und T-Zellen hemmen. Im Gegensatz dazu nutzen DCs die Präsentation von Pathogenen durch den MHC I-Komplex um zytotoxische T-Zellen zu aktivieren. MHC II hingegen wird nur auf der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und führt über die Präsentation von Fremdpeptiden zur Aktivierung von CD4⁺ T-Helferzellen (Kaufmann 2009; Janeway et al. 2001). Parallel zur hohen Viruslast in der frühen akuten Phase der FV Infektion stieg auch die Expression der MHC I und der MHC II mRNA unabhängig von der Sauerstoffkonzentration in den dendritischen Zellen aus HIF-1 α ^{+f/+f} und CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen deutlich an. Mit abnehmender Viruslast und FV mRNA Expression in den DCs sank auch die mRNA Expression der MHC-Komplexe, welche durch die rezidivierende FV Infektion in den HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen nach 12 Wochen nicht erneut induziert werden konnte. Die Analyse der MHC I und MHC II Expression nach FV Infektion beschränkt sich in der Literatur auf die Darstellung der Oberflächenexpression auf den Immunzellen mittels Durchflusszytometer, welche mit den vorliegenden Daten vergleichbar sind (Ejaz et al. 2012; Balkow et al. 2007). Die Genexpression der MHC Komplexe findet nur insofern Beachtung, dass die immunologische Resistenz von C57Bl/6 Mäusen über den H-2^{b/b} Locus des MHC-Komplexes vermittelt wird (Lilly 1968). Der Fokus bisher publizierter Untersuchungen des MHC Komplexes liegt daher entweder auf der Oberflächenexpression oder auf dem Einfluss der Unterschiede im H-2 Locus der Mäuse auf den Verlauf der FV Infektion.

Während MHC-Komplexe vor allem für die Präsentation von Fremdpeptiden zuständig sind erfolgt die Identifikation einzelsträngiger viraler FV RNA durch den endosomal lokalisierten TLR7. Die Aktivierung von TLR7, welcher vornehmlich von DCs aber auch von B-Zellen, NK-Zellen und myeloischen Zellen exprimiert wird, führt sowohl zur Synthese von Typ I Interferonen und inflammatorischen Zytokinen als auch zur Reifung der DCs (Liberatore & Bieniasz 2011). Die hohe Viruslast und die signifikant erhöhte FV mRNA in den DCs nach 5 Tagen akuter Infektion führte zu einer erhöhten TLR7 mRNA Expression in HIF-1 α ^{+f/+f} und CD11cCre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen, welche durch hypoxische Inkubation der DCs zusätzlich gesteigert werden konnte. Wenngleich die Liganden-induzierte Aktivierung über TLR7 durch virale ssRNA oder durch den synthetischen Liganden R848 zur Akkumulation von HIF-1 α in Makrophagen unter Normoxie führt (Nicholas & Sumbayev 2009), ist diese Induktion nicht allein auf Zellen des angeborenen Immunsystems begrenzt. Der durch TLR7 aktivierte Signalweg induziert auch in B-Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen eine rasche Immunantwort (Browne 2013). Während die Aktivierung von TLR7 nach einer akuten FV Infektion in den

B-Zellen zur schnellen Freisetzung von nicht neutralisierenden IgM gegen FV führt und damit die akute Virusinfektion limitiert, ist die immunregulatorische Wirkung auf die Infektion durch die DCs jedoch nur zum Teil von TLR7 induzierten Signalwegen abhängig (Browne & Littman 2009; Browne 2011).

Wenngleich die Mechanismen bisher nicht geklärt werden konnten, scheint die hohe Viruslast in der frühen akuten FV Infektion einen direkt Einfluss auf die Expression der HIF-1 α mRNA, des HIF-1 α Proteins und auf die HIF-1 Zielgene zu haben. Auch die Expression wichtiger Faktoren für die Immunantwort wie TLR7 oder MHC I und MHC II korrelierte während der akuten Infektion direkt mit der Viruslast. Gleichzeitig nahm jedoch die Oberflächenexpression von MHC I im Verlauf der gesamten Virusinfektion beständig zu, was sich gut durch die erhöhte MHC I mRNA Expression während der frühen Akutinfektion erklären ließe. Da die MHC-Komplexe in den Zellen konstitutiv exprimiert werden, könnte diese zunehmende Zahl an MHC I exprimierenden DCs mit einer virusinduzierten Stabilisierung des MHC I-Komplexes in Verbindung stehen, welche bereits für MCMV Infektionen beschrieben wurde (Holtappels et al. 2006). Die rezidivierende FV Infektion in den HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen resultierte *in vivo* in einer Vielzahl an unterschiedlichen Immunreaktionen, welche trotz des erhöhten FV mRNA Levels in den BmDCs dieser Tiere zu keinen Veränderungen in der Genexpression führte. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in einer Verunreinigung der BmDC-Kultur durch MDSCs liegen, welche in der Lage sind durch ihre inhibitorischen Einflüsse die Aktivität und Differenzierung der dendritischen Zellen zu reduzieren (Cheng et al. 2008). Insgesamt konnten keine entscheidenden Unterschiede in der virusinduzierten Genantwort CD11c⁺ dendritischer Zellen mit einem konditionellen HIF-1 α Knock-out verglichen zur Genantwort der Kontrollzellen mit funktionellem HIF-1 α festgestellt werden.

6 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktorkomplex Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF)-1 reguliert sowohl die zelluläre Anpassung an eine sauerstoffarme Umgebung als auch das Genexpressionsprofil von dendritischen Zellen (DC) und Makrophagen bei Entzündungsprozessen. Um den Einfluss einer HIF-1 Defizienz auf virale Infektionen zu untersuchen, wurden Kontrollmäuse und Mäuse mit einem konditionellen HIF-1 α Knock-out in dendritischen Zellen mit dem murinen Friend Leukämievirus (FV) infiziert. In suszeptiblen Mäusen verursacht die FV Infektion eine Epo-unabhängige tödliche Erythroleukämie und Splenomegalie, resistente Mäuse wie unsere Versuchstiere hingegen reagieren auf eine akute FV Infektion mit einer starken Immunantwort, welche in eine persistierende Infektion übergeht.

Die akute FV Infektion führte zu keinen Unterschieden in den Milzgewichten und der Immunantwort bei Kontroll- und Knock-out-Mäusen, jedoch wiesen Tiere mit funktionellem dendritischem HIF-1 α einen partiellen Verlust der Milzarchitektur auf. Vor allem die frühe Akutinfektion beeinflusste die Genexpression in den dendritischen Zellen, welche sowohl zu einer Induktion der HIF-1 α mRNA- und HIF-1 Zielgenexpression als auch einer erhöhten Genexpression der MHC-Komplexe sowie des Toll-like Rezeptors 7 führte. Erst die späte Akutinfektion resultierte in einer vermehrten HIF-1 α Proteinakkumulation und einer gesteigerten Aktivierung der dendritischen Zellen. Dabei waren die aktivierten DCs aus Kontroll- und Knock-out-Mäusen dazu in der Lage die Aktivierung und zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen, welche bei den Knock-out-Tieren stärker ausfiel und maßgeblich für die Limitierung der akuten FV verantwortlich war, *in vivo* und *in vitro* zu induzieren. Während alle Knock-out-Tiere in der Lage waren die Virusreplikation nach chronischer FV Infektion einzuschränken und sich vollständig von der Infektion zu erholen, entwickelten einige der Kontrollmäuse eine rezidivierende Infektion. Dabei führte die FV-induzierte Erythrozytenproliferation zu einer massiven Splenomegalie, welche von einem kompletten Verlust der Milzarchitektur begleitet wurde. Zudem konnte in diesen Mäusen eine erhöhte Anzahl an dendritischen Zellen, Makrophagen und Granulozyten sowie eine verminderte Anzahl an adaptiven Immunzellen nachgewiesen werden. Der zeitgleiche signifikante Anstieg von myeloischen Suppressorzellen schien im direkten Zusammenhang mit der Depletion der Lymphozytenpopulation und der rezidivierenden chronischen FV Infektion zu stehen.

Daraus folgernd unterstützt die HIF-1 α Defizienz der dendritischen Zellen während einer Langzeitinfektion die Erholung und Einschränkung der Virusreplikation, so dass das dendritische HIF-1 α insgesamt einen wichtigen Einfluss auf den Verlauf von chronischen Virusinfektionen haben könnte.

Summary

In addition to cellular adaption to hypoxia the transcription factor complex hypoxia-inducible factor (HIF)-1 regulates the gene expression profile of dendritic cells (DC) and macrophages during inflammation. To investigate the activation and influence of HIF-1 deficiency in viral infections we infected control and CD11c⁺ dendritic cell specific HIF-1 α knockout mice with the murine Friend leukemia virus (FV) to cause an acute or a chronic infection. Resistant mice like our experimental animals are known to become persistently infected after developing a strong immune response during the acute phase of infection, while FV induces an Epo independent lethal erythroleukemia and splenomegaly in susceptible mice. After acute Friend virus infection we did not find differences in spleen weight and immune cell populations but a partial loss of spleen architecture of mice with a functional dendritic HIF-1 α . Early acute FV infection influenced the gene expression profile of dendritic cells and led to an increase of HIF-1 α mRNA and HIF-1 target gene expression as well as an upregulation of the gene expression of MHC complexes and *Toll*-like receptor 7. Only after late acute infection we detected an increased induction of HIF-1 α protein and activation of the dendritic cells. Both activated control and knock-out DCs were able to induce the activation and cytotoxic activity of CD8⁺ T cells *in vivo* and *in vitro* which was primarily responsible for limiting the acute FV infection and was induced to a greater extent by Knock-out mice. Following chronic FV infection all knock-out mice were able to restrict viral replication, whereas some of the control mice developed a recurrent infection accompanied by a massive splenomegaly. This led to a complete loss of splenic architecture which was due to FV induced erythrocyte proliferation. Additionally, these mice showed an increased number of dendritic cells, macrophages, and granulocytes and a decreased adaptive immune cell population. Concurrently we detected a significant increase of myeloid derived suppressor cells which seemed to be interdependent with the depletion of lymphocytes and the recurrent chronic FV infection.

Thus, our results indicate that HIF-1 α deficiency in dendritic cells promotes a better recovery and restriction of viral replication after long-term infection and that dendritic HIF-1 α may have an important influence on the course of chronic infection.

7 Literaturverzeichnis

- Abramson, S.L. & Gallin, J.I.** (1990). IL-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 144(2), pp.625–30.
- Aderem, A. & Underhill, D.M.** (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology*, 17, pp.593–623.
- Alari-Pahissa, E., Notario, L., Lorente, E., Vega-Ramos, J., Justel, A., López, D., Villadangos, J. a, & Lauzurica, P.** (2012). CD69 does not affect the extent of T cell priming. *PloS one*, 7(10), p.e48593.
- Allison, J.P.** (1994). CD28-B7 interactions in T-cell activation. *Current opinion in immunology*, 6(3), pp.414–9.
- Allman, D., Srivastava, B., & Lindsley, R.C.** (2004). Alternative routes to maturity: branch points and pathways for generating follicular and marginal zone B cells. *Immunological reviews*, 197, pp.147–60.
- Almand, B., Clark, J.I., Nikitina, E., van Beynen, J., English, N.R., Knight, S.C., Carbone, D.P., & Gabrilovich, D.I.** (2001). Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(1), pp.678–89.
- Alt, F.W., Blackwell, T.K., DePinho, R.A., Reth, M.G., & Yancopoulos, G.D.** (1986). Regulation of genome rearrangement events during lymphocyte differentiation. *Immunological reviews*, 89, pp.5–30.
- Anderson, G. & Takahama, Y.** (2012). Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends in immunology*, 33(6), pp.256–63.
- Arany, Z., Huang, L.E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M.A., Bunn, H.F., & Livingston, D.M.** (1996). An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(23), pp.12969–73.
- Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., Vicari, A., O’Garra, A. et al.** (2001). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nature immunology*, 2(12), pp.1144–50.
- Austyn, J.M. & Gordon, S.** (1981). F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *European journal of immunology*, 11(10), pp.805–15.
- Balkow, S., Krux, F., Loser, K., Becker, J.U., Grabbe, S., & Dittmer, U.** (2007). Friend retrovirus infection of myeloid dendritic cells impairs maturation, prolongs contact to naive T cells, and favors expansion of regulatory T cells. *Blood*, 110(12), pp.3949–58.

- Banchereau, J. & Steinman, R.M.** (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), pp.245–52.
- Bánki, Z., Posch, W., Ejaz, A., Oberhauser, V., Willey, S., Gassner, C., Stoiber, H., Dittmer, U. et al.** (2010). Complement as an endogenous adjuvant for dendritic cell-mediated induction of retrovirus-specific CTLs. *PLoS pathogens*, 6(4), p.e1000891.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C. et al.** (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Revista de investigación clínica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutrición*, 56(2), pp.126–9.
- Benita, Y., Kikuchi, H., Smith, A.D., Zhang, M.Q., Chung, D.C., & Xavier, R.J.** (2009). An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic acids research*, 37(14), pp.4587–602.
- Berra, E., Richard, D.E., Gothié, E., & Pouyssegur, J.** (2001). HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 α degradation. *FEBS letters*, 491(1-2), pp.85–90.
- Bittner, J.J.** (1936). Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 84(2172), p.162.
- Borden, E.C., Sen, G.C., Uze, G., Silverman, R.H., Ransohoff, R.M., Foster, G.R., & Stark, G.R.** (2007). Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nature reviews. Drug discovery*, 6(12), pp.975–90.
- Bottazzi, B., Garlanda, C., Salvatori, G., Jeannin, P., Manfredi, A., & Mantovani, A.** (2006). Pentraxins as a key component of innate immunity. *Current opinion in immunology*, 18(1), pp.10–5.
- Browne, E.P.** (2011). Toll-like receptor 7 controls the anti-retroviral germinal center response. *PLoS pathogens*, 7(10), p.e1002293.
- Browne, E.P.** (2013). Toll-like receptor 7 inhibits early acute retroviral infection through rapid lymphocyte responses. *Journal of virology*, 87(13), pp.7357–66.
- Browne, E.P. & Littman, D.R.** (2009). Myd88 is required for an antibody response to retroviral infection. *PLoS pathogens*, 5(2), p.e1000298.
- Brun-Vézinet, F., Rouzioux, C., Montagnier, L., Chamaret, S., Gruest, J., Barré-Sinoussi, F., Geroldi, D., Chermann, J.C. et al.** (1984). Prevalence of antibodies to lymphadenopathy-associated retrovirus in African patients with AIDS. *Science (New York, N.Y.)*, 226(4673), pp.453–6.
- Bryant, C.D., Zhang, N.N., Sokoloff, G., Fanselow, M.S., Ennes, H.S., Palmer, A.A., & McRoberts, J.A.** (2008). Behavioral differences among C57BL/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies. *Journal of neurogenetics*, 22(4), pp.315–31.

- Bukowski, J.F. & Welsh, R.M.** (1985). Inability of interferon to protect virus-infected cells against lysis by natural killer (NK) cells correlates with NK cell-mediated antiviral effects in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 135(5), pp.3537–41.
- Cao, H., Wolff, R.G., Meltzer, M.S., & Crawford, R.M.** (1989). Differential regulation of class II MHC determinants on macrophages by IFN-gamma and IL-4. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 143(11), pp.3524–31.
- Carroll, M.C.** (2004). The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature immunology*, 5(10), pp.981–6.
- Caton, M.L., Smith-Raska, M.R., & Reizis, B.** (2007). Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8⁺ dendritic cells in the spleen. *The Journal of experimental medicine*, 204(7), pp.1653–64.
- Cheng, P., Corzo, C.A., Luetsteke, N., Yu, B., Nagaraj, S., Bui, M.M., Ortiz, M., Nicken, W. et al.** (2008). Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *The Journal of experimental medicine*, 205(10), pp.2235–49.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1), pp.156–9.
- Cmarik, J. & Ruscetti, S.** (2010). Friend Spleen Focus-Forming Virus Activates the Tyrosine Kinase src and the Transcription Factor PU.1 to Cause a Multi-Stage Erythroleukemia in Mice. *Viruses*, 2(10), pp.2235–57.
- Coffin, J.M., Hughes, S.H., & Varmus, H.E.** (1997). *Retroviruses* J. M. Coffin, S. H. Hughes, & H. E. Varmus, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Coffman, R.L.** (2006). Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. *Nature immunology*, 7(6), pp.539–41.
- Corn, P.G., Ricci, M.S., Scata, K.A., Arsham, A.M., Simon, M.C., Dicker, D.T., & El-Deiry, W.S.** (2005). Mxi1 is induced by hypoxia in a HIF-1-dependent manner and protects cells from c-Myc-induced apoptosis. *Cancer biology & therapy*, 4(11), pp.1285–94.
- Corzo, C. a, Condamine, T., Lu, L., Cotter, M.J., Youn, J.-I., Cheng, P., Cho, H.-I., Celis, E. et al.** (2010). HIF-1 α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *The Journal of experimental medicine*, 207(11), pp.2439–53.
- Cox, M. a, Kahan, S.M., & Zajac, A.J.** (2013). Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love. *Virology*, 435(1), pp.157–69.
- Cramer, T. & Johnson, R.S.** (2003). A novel role for the hypoxia inducible transcription factor HIF-1 α : critical regulation of inflammatory cell function. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 2(3), pp.192–3.

- Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B.E., Förster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V.H., Jaenisch, R. et al.** (2003). HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*, 112(5), pp.645–57.
- Cravens, P.D. & Lipsky, P.E.** (2002). Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. *Immunology and cell biology*, 80(5), pp.497–505.
- Deshmane, S.L., Amini, S., Sen, S., Khalili, K., & Sawaya, B.E.** (2011). Regulation of the HIV-1 promoter by HIF-1 α and Vpr proteins. *Virology journal*, 8(1), p.477.
- Dittmer, U., Brooks, D.M., & Hasenkrug, K.J.** (1999). Requirement for multiple lymphocyte subsets in protection by a live attenuated vaccine against retroviral infection. *Nature medicine*, 5(2), pp.189–93.
- Dittmer, U. & Hasenkrug, K.J.** (2001). Cellular and molecular mechanisms of vaccine-induced protection against retroviral infections. *Current molecular medicine*, 1(4), pp.431–6.
- Dittmer, U., Race, B., Peterson, K.E., Stromnes, I.M., Messer, R.J., & Hasenkrug, K.J.** (2002). Essential roles for CD8⁺ T cells and gamma interferon in protection of mice against retrovirus-induced immunosuppression. *Journal of virology*, 76(1), pp.450–4.
- Doerfler, W.** (1996). *Viren - Krankheitserreger oder Trojanisches Pferd* Springer Berlin Heidelberg.
- Doom, C.M. & Hill, A.B.** (2008). MHC class I immune evasion in MCMV infection. *Medical microbiology and immunology*, 197(2), pp.191–204.
- Dranoff, G.** (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 4(1), pp.11–22.
- Dunn, G.P., Koebel, C.M., & Schreiber, R.D.** (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature reviews. Immunology*, 6(11), pp.836–48.
- Ejaz, A., Ammann, C.G., Werner, R., Huber, G., Oberhauser, V., Hörl, S., Schimmer, S., Dittmer, U. et al.** (2012). Targeting viral antigens to CD11c on dendritic cells induces retrovirus-specific T cell responses. *PloS one*, 7(9), p.e45102.
- Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., & Fujii-Kuriyama, Y.** (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(9), pp.4273–8.
- Enders, J.F. & Peebles, T.C.** (1954). Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 86(2), pp.277–86.

- Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E. et al.** (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107(1), pp.43–54.
- Fandrey, J.** (2007). Regulation der Sauerstoffhomöostase durch HIF-1. *BIOspektrum*, 01.07, pp.26–28.
- Faria, A.M.C. & Weiner, H.L.** (2006). Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clinical & developmental immunology*, 13(2-4), pp.143–57.
- Frank, M.M. & Fries, L.F.** (1991). The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunology today*, 12(9), pp.322–6.
- Frede, S., Stockmann, C., Freitag, P., & Fandrey, J.** (2006). Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *The Biochemical journal*, 396(3), pp.517–27.
- Frede, S., Stockmann, C., Winning, S., Freitag, P., & Fandrey, J.** (2009). Hypoxia-inducible factor (HIF) 1alpha accumulation and HIF target gene expression are impaired after induction of endotoxin tolerance. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(10), pp.6470–6.
- Friend, C.** (1957). Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia. *The Journal of experimental medicine*, 105(4), pp.307–18.
- Fujita, M., Kohanbash, G., Fellows-Mayle, W., Hamilton, R.L., Komohara, Y., Decker, S.A., Ohlfest, J.R., & Okada, H.** (2011). COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research*, 71(7), pp.2664–74.
- Gabrilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravtsov, V., Nadaf, S., & Carbone, D.P.** (1998). Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood*, 92(11), pp.4150–66.
- Gabrilovich, D.I. & Nagaraj, S.** (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 9(3), pp.162–74.
- Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., & Bronte, V.** (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature reviews. Immunology*, 12(4), pp.253–68.
- Gainey, M.D., Rivenbark, J.G., Cho, H., Yang, L., & Yokoyama, W.M.** (2012). Viral MHC class I inhibition evades CD8+ T-cell effector responses in vivo but not CD8+ T-cell priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(47), pp.E3260–7.
- Gallo, R.C.** (1986). HTLV: the family of human T-lymphotropic retroviruses and their role in leukemia and AIDS. *Medical oncology and tumor pharmacotherapy*, 3(3-4), pp.265–7.
- Gallo, R.C. & Meyskens, F.L.** (1978). Evidence for the presence of RNA tumor virus components in human leukemia. *Progress in experimental tumor research*, 21, pp.216–49.

- Garg, A. & Spector, S. a** (2013). HIV Type 1 gp120-Induced Expansion of Myeloid Derived Suppressor Cells Is Dependent on Interleukin 6 and Suppresses Immunity. *The Journal of infectious diseases*, pp.1–11.
- Gauthier, L., Rossi, B., Roux, F., Termine, E., & Schiff, C.** (2002). Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), pp.13014–9.
- Geissmann, F., Gordon, S., Hume, D.A., Mowat, A.M., & Randolph, G.J.** (2010). Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nature reviews. Immunology*, 10(6), pp.453–60.
- Geissmann, Frederic, Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., & Ley, K.** (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5966), pp.656–61.
- Gerber, S.A. & Pober, J.S.** (2008). IFN-alpha induces transcription of hypoxia-inducible factor-1alpha to inhibit proliferation of human endothelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(2), pp.1052–62.
- Gerlach, C., van Heijst, J.W.J., Swart, E., Sie, D., Armstrong, N., Kerkhoven, R.M., Zehn, D., Bevan, M.J. et al.** (2010). One naive T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation. *The Journal of experimental medicine*, 207(6), pp.1235–46.
- Goh, C., Narayanan, S., & Hahn, Y.S.** (2013). Myeloid-derived suppressor cells: the dark knight or the joker in viral infections? *Immunological reviews*, 255(1), pp.210–21.
- Gordan, J.D., Bertout, J.A., Hu, C.-J., Diehl, J.A., & Simon, M.C.** (2007). HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer cell*, 11(4), pp.335–47.
- Gordon, S.** (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature reviews. Immunology*, 3(1), pp.23–35.
- Greaves, M.F. & Brown, G.** (1973). A human B lymphocyte specific antigen. *Nat New Biol*, 246(152), pp.116–119.
- Green, K.A., Cook, W.J., & Green, W.R.** (2013). Myeloid-derived suppressor cells in murine retrovirus-induced AIDS inhibit T- and B-cell responses in vitro that are used to define the immunodeficiency. *Journal of virology*, 87(4), pp.2058–71.
- Gu, Y.Z., Moran, S.M., Hogenesch, J.B., Wartman, L., & Bradfield, C.A.** (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene expression*, 7(3), pp.205–13.
- Gutcher, I. & Becher, B.** (2007). APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 117(5), pp.1119–27.
- Hähnel, V.** (2003). *Die transkriptionelle Regulation der Toll-like Rezeptoren (TLR2, TLR3 und TLR4) in mononukleären Phagozyten*. University of Regensburg.

- Halemano, K., Harper, M.S., Guo, K., Li, S.X., Heilman, K.J., Barrett, B.S., & Santiago, M.L.** (2013). Humoral immunity in the Friend retrovirus infection model. *Immunologic research*, 55(1-3), pp.249–60.
- Hanabuchi, S., Koyanagi, M., Kawasaki, A., Shinohara, N., Matsuzawa, A., Nishimura, Y., Kobayashi, Y., Yonehara, S. et al.** (1994). Fas and its ligand in a general mechanism of T-cell-mediated cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(11), pp.4930–4.
- Hasenkrug, K.J., Brooks, D.M., & Dittmer, U.** (1998). Critical role for CD4(+) T cells in controlling retrovirus replication and spread in persistently infected mice. *Journal of virology*, 72(8), pp.6559–64.
- Hasenkrug, K.J. & Chesebro, B.** (1997). Immunity to retroviral infection: the Friend virus model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(15), pp.7811–6.
- Hegde, S., Ni, S., He, S., Yoon, D., Feng, G.S., Watowich, S.S., Paulson, R.F., & Hankey, P.A.** (2009). Stat3 promotes the development of erythroleukemia by inducing Pu.1 expression and inhibiting erythroid differentiation. *Oncogene*, 28(38), pp.3349–59.
- Hickman, H.D., Takeda, K., Skon, C.N., Murray, F.R., Hensley, S.E., Loomis, J., Barber, G.N., Bennink, J.R. et al.** (2008). Direct priming of antiviral CD8+ T cells in the peripheral interfollicular region of lymph nodes. *Nature immunology*, 9(2), pp.155–65.
- Hoatlin, M.E. & Kabat, D.** (1995). Host-range control of a retroviral disease: Friend erythroleukemia. *Trends in microbiology*, 3(2), pp.51–7.
- Hogquist, K. a, Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., & Carbone, F.R.** (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell*, 76(1), pp.17–27.
- Holmskov, U., Thiel, S., & Jensenius, J.C.** (2003). Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annual review of immunology*, 21, pp.547–78.
- Holtappels, R., Gillert-Marien, D., Thomas, D., Podlech, J., Deegen, P., Herter, S., Oehrlein-Karpi, S.A., Strand, D. et al.** (2006). Cytomegalovirus encodes a positive regulator of antigen presentation. *Journal of virology*, 80(15), pp.7613–24.
- Hume, D. a** (2008). Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(9), pp.5829–35.
- Hunter, E. & Swanstrom, R.** (1990). Retrovirus envelope glycoproteins. *Current topics in microbiology and immunology*, 157, pp.187–253.
- Hüsecken, Y.** (2008). *Infektion von verschiedenen Zellpopulationen in Knochenmark und Milz durch das Friend Retrovirus*. University of Duisburg-Essen.
- Hüsecken, Y.P.** (2010). *Einfluss der Kultivierung dendritischer Zellen auf die Genexpression unter Hypoxie sowie nach inflammatorischer Stimulation*. University of Duisburg-Essen.

ICTV (2013). International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).

Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M. et al. (2001). HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5516), pp.464–8.

Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F. et al. (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5516), pp.468–72.

Janeway, C.J., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. (2001). Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. (5th ed.). New York: Garland Science.

Jang, M.S., Park, J.E., Lee, J. a, Park, S.G., Myung, P.K., Lee, D.H., Park, B.C., & Cho, S. (2005). Binding and regulation of hypoxia-inducible factor-1 by the inhibitory PAS proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, 337(1), pp.209–15.

John, B., Harris, T.H., Tait, E.D., Wilson, E.H., Gregg, B., Ng, L.G., Mrass, P., Roos, D.S. et al. (2009). Dynamic Imaging of CD8(+) T cells and dendritic cells during infection with *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens*, 5(7), p.e1000505.

Jones, S.M., Moors, M.A., Ryan, Q., Klyczek, K.K., & Blank, K.J. (1992). Altered macrophage antigen-presenting cell function following Friend leukemia virus infection. *Viral immunology*, 5(3), pp.201–11.

Junqueira, L.C.U. & Carneiro, J. (2004). Immunsystem und lymphatische Organe. (6. ed.). *Histologie* Springer Berlin Heidelberg, p. 479.

Kabat, D. (1989). Molecular biology of Friend viral erythroleukemia. *Current topics in microbiology and immunology*, 148, pp.1–42.

Kaidi, A., Qualtrough, D., Williams, A.C., & Paraskeva, C. (2006). Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia. *Cancer research*, 66(13), pp.6683–91.

Kamphorst, A.O., Guermonprez, P., Dudziak, D., & Nussenzweig, M.C. (2010). Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(6), pp.3426–35.

Kane, M. & Golovkina, T. (2010). Common threads in persistent viral infections. *Journal of virology*, 84(9), pp.4116–23.

Kapp, J. a, Honjo, K., Kapp, L.M., Xu, X.Y., Cozier, A., & Bucy, R.P. (2006). TCR transgenic CD8+ T cells activated in the presence of TGF β express FoxP3 and mediate linked suppression of primary immune responses and cardiac allograft rejection. *International immunology*, 18(11), pp.1549–62.

Kaufmann, S.E. (2009). Mononukleäre Phagozyten und antigenpräsentierende Zellen. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* Springer Berlin Heidelberg, pp. 91–98.

- Khazen, W., M'bika, J.-P., Tomkiewicz, C., Benelli, C., Chany, C., Achour, A., & Forest, C.** (2005). Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. *FEBS letters*, 579(25), pp.5631–4.
- Kilani, M.M., Mohammed, K.A., Nasreen, N., Tepper, R.S., & Antony, V.B.** (2004). RSV causes HIF-1 α stabilization via NO release in primary bronchial epithelial cells. *Inflammation*, 28(5), pp.245–51.
- Kong, T., Westerman, K.A., Faigle, M., Eltzschig, H.K., & Colgan, S.P.** (2006). HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(13), pp.2242–50.
- König, R., Huang, L.Y., & Germain, R.N.** (1992). MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature*, 356(6372), pp.796–8.
- Kopf, M., Coyle, A.J., Schmitz, N., Barner, M., Oxenius, A., Gallimore, A., Gutierrez-Ramos, J.C., & Bachmann, M.F.** (2000). Inducible costimulator protein (ICOS) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection. *The Journal of experimental medicine*, 192(1), pp.53–61.
- Kurimoto, I., Grammer, S.F., Shimizu, T., Nakamura, T., & Streilein, J.W.** (1995). Role of F4/80+ cells during induction of hapten-specific contact hypersensitivity. *Immunology*, 85(4), pp.621–9.
- Kusmartsev, S. & Gabrilovich, D.I.** (2003). Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species. *Journal of leukocyte biology*, 74(2), pp.186–96.
- Lander, M.R. & Chattopadhyay, S.K.** (1984). A Mus dunni cell line that lacks sequences closely related to endogenous murine leukemia viruses and can be infected by ectropic, amphotropic, xenotropic, and mink cell focus-forming viruses. *Journal of virology*, 52(2), pp.695–8.
- LeBien, T.W. & Tedder, T.F.** (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112(5), pp.1570–80.
- Lechner, M.G., Megiel, C., Russell, S.M., Bingham, B., Arger, N., Woo, T., & Epstein, A.L.** (2011). Functional characterization of human Cd33+ and Cd11b+ myeloid-derived suppressor cell subsets induced from peripheral blood mononuclear cells co-cultured with a diverse set of human tumor cell lines. *Journal of translational medicine*, 9, p.90.
- Lee, P.P., Fitzpatrick, D.R., Beard, C., Jessup, H.K., Lehar, S., Makar, K.W., Pérez-Melgosa, M., Sweetser, M.T. et al.** (2001). A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity*, 15(5), pp.763–74.
- Levy, J.A., Hoffman, A.D., Kramer, S.M., Landis, J.A., Shimabukuro, J.M., & Oshiro, L.S.** (1984). Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science (New York, N.Y.)*, 225(4664), pp.840–2.

- Lewis, K.L. & Reizis, B.** (2012). Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological tolerance. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(8), p.a007401.
- Liberatore, R. a & Bieniasz, P.D.** (2011). Sensing retroviruses. *Immunity*, 35(1), pp.8–10.
- Life Technologies Corporation** (2013). Fluorescence Tutorial.
- Lilly, F.** (1968). The effect of histocompatibility-2 type on response to friend leukemia virus in mice. *The Journal of experimental medicine*, 127(3), pp.465–73.
- Liu, B., Tonkonogy, S.L., & Sartor, R.B.** (2011). Antigen-presenting cell production of IL-10 inhibits T-helper 1 and 17 cell responses and suppresses colitis in mice. *Gastroenterology*, 141(2), pp.653–62, 662.e1–4.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), pp.402–8.
- Loboda, A., Jozkowicz, A., & Dulak, J.** (2010). HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. *Molecules and cells*, 29(5), pp.435–42.
- Löffler, G., Petrides, P.E., & Heinrich, P.C.** (2007). *Biochemie und Pathobiochemie* (8. ed.). G. Löffler, P. E. Petrides, & P. C. Heinrich, eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Löfstedt, T., Fredlund, E., Noguera, R., Navarro, S., Holmquist-Mengelbier, L., Beckman, S., Pålman, S., & Axelson, H.** (2009). HIF-1alpha induces MXI1 by alternate promoter usage in human neuroblastoma cells. *Experimental cell research*, 315(11), pp.1924–36.
- Loisel-Meyer, S., Swainson, L., Craveiro, M., Oburoglu, L., Mongellaz, C., Costa, C., Martinez, M., Cosset, F.-L. et al.** (2012). Glut1-mediated glucose transport regulates HIV infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7), pp.2549–54.
- Lord, S.J., Rajotte, R. V, Korbitt, G.S., & Bleackley, R.C.** (2003). Granzyme B: a natural born killer. *Immunological reviews*, 193, pp.31–8.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), pp.265–75.
- Ma, C.S., Deenick, E.K., Batten, M., & Tangye, S.G.** (2012). The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *The Journal of experimental medicine*, 209(7), pp.1241–53.
- Madigan, M.T. & Martinko, J.M.** (2006). Essentials of immunology. (11th ed.). *Brock Biology of Microorganisms* Pearson Prentice Hall, pp. 727–760.
- Maetzig, T., Galla, M., Baum, C., & Schambach, A.** (2011). Gammaretroviral vectors: biology, technology and application. *Viruses*, 3(6), pp.677–713.

- Mahalingam, S. & Karupiah, G.** (1999). Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases. *Immunology and cell biology*, 77(6), pp.469–75.
- Mahon, P.C., Hirota, K., & Semenza, G.L.** (2001). FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes & development*, 15(20), pp.2675–86.
- Makino, Y., Kanopka, A., Wilson, W.J., Tanaka, H., & Poellinger, L.** (2002). Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus. *The Journal of biological chemistry*, 277(36), pp.32405–8.
- Maltzman, J.S. & Haase, V.H.** (2008). Low oxygen stimulates the immune system. *Kidney international*, 73(7), pp.797–9.
- Marcelletti, J. & Furmanski, P.** (1979). Infection of macrophages with Friend virus: relationship to the spontaneous regression of viral erythroleukemia. *Cell*, 16(3), pp.649–59.
- Martinez, F.O., Helming, L., & Gordon, S.** (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology*, 27, pp.451–83.
- Maybin, J.A., Battersby, S., Hirani, N., Nikitenko, L.L., Critchley, H.O.D., & Jabbour, H.N.** (2011). The expression and regulation of adrenomedullin in the human endometrium: a candidate for endometrial repair. *Endocrinology*, 152(7), pp.2845–56.
- Maynard, M.A., Qi, H., Chung, J., Lee, E.H.L., Kondo, Y., Hara, S., Conaway, R.C., Conaway, J.W. et al.** (2003). Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *The Journal of biological chemistry*, 278(13), pp.11032–40.
- Mayordomo, J.I., Zorina, T., Storkus, W.J., Zitvogel, L., Garcia-Prats, M.D., DeLeo, a B., & Lotze, M.T.** (1997). Bone marrow-derived dendritic cells serve as potent adjuvants for peptide-based antitumor vaccines. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 15(2), pp.94–103.
- McKnight, A.J. & Gordon, S.** (1998). The EGF-TM7 family: unusual structures at the leukocyte surface. *Journal of leukocyte biology*, 63(3), pp.271–80.
- Medzhitov, R.** (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164), pp.819–826.
- Metchnikoff, E.** (1905). *Immunity in Infective Diseases* Cambridge University Press Warehouse.
- Metzen, E., Zhou, J., Jelkmann, W., Fandrey, J., & Brüne, B.** (2003). Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. *Molecular biology of the cell*, 14(8), pp.3470–81.
- Michalek, R.D. & Rathmell, J.C.** (2010). The metabolic life and times of a T-cell. *Immunological reviews*, 236, pp.190–202.

- Milstein, O., Hagin, D., Lask, A., Reich-Zeliger, S., Shezen, E., Ophir, E., Eidelstein, Y., Afik, R. et al.** (2011). CTLs respond with activation and granule secretion when serving as targets for T-cell recognition. *Blood*, 117(3), pp.1042–52.
- Miltenyi Biotec** (2013). MACS Technology.
- Modrow, S., Falke, D., Schatzl, H., & Truyen, U.** (2010). Retroviren. (3. ed.). *Molekulare Virologie* Springer Berlin Heidelberg, pp. 408–440.
- Moreau-Gachelin, F.** (2008). Multi-stage Friend murine erythroleukemia: molecular insights into oncogenic cooperation. *Retrovirology*, 5, p.99.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., & Coffman, R.L.** (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 136(7), pp.2348–57.
- Mosser, D.M.** (2003). The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 73(2), pp.209–212.
- Moussion, C., Ortega, N., & Girard, J.-P.** (2008). The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel “alarmin”? *PloS one*, 3(10), p.e3331.
- Murphy, E.A., Davis, J.M., Brown, A.S., Carmichael, M.D., Ghaffar, A., & Mayer, E.P.** (2008). Effect of IL-6 deficiency on susceptibility to HSV-1 respiratory infection and intrinsic macrophage antiviral resistance. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 28(10), pp.589–95.
- Nair, S.R., Zelinskyy, G., Schimmer, S., Gerlach, N., Kassiotis, G., & Dittmer, U.** (2010). Mechanisms of control of acute Friend virus infection by CD4+ T helper cells and their functional impairment by regulatory T cells. *The Journal of general virology*, 91(Pt 2), pp.440–51.
- Naldini, A., Carraro, F., Fleischmann, W.R., & Bocci, V.** (1993). Hypoxia enhances the antiviral activity of interferons. *Journal of interferon research*, 13(2), pp.127–32.
- Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E., & Rubin, B.Y.** (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *The Journal of experimental medicine*, 158(3), pp.670–89.
- Nicholas, S. a & Sumbayev, V. V** (2009). The involvement of hypoxia-inducible factor 1 alpha in Toll-like receptor 7/8-mediated inflammatory response. *Cell research*, 19(8), pp.973–83.
- Norris, B. a, Uebelhoer, L.S., Nakaya, H.I., Price, A. a, Grakoui, A., & Pulendran, B.** (2013). Chronic but not acute virus infection induces sustained expansion of myeloid suppressor cell numbers that inhibit viral-specific T cell immunity. *Immunity*, 38(2), pp.309–21.

- Oda, T., Hirota, K., Nishi, K., Takabuchi, S., Oda, S., Yamada, H., Arai, T., Fukuda, K. et al. (2006). Activation of hypoxia-inducible factor 1 during macrophage differentiation. *American journal of physiology. Cell physiology*, 291(1), pp.C104–13.
- Ogawa, T., Tsuji-Kawahara, S., Yuasa, T., Kinoshita, S., Chikaishi, T., Takamura, S., Matsumura, H., Seya, T. et al. (2011). Natural killer cells recognize friend retrovirus-infected erythroid progenitor cells through NKG2D-RAE-1 interactions In Vivo. *Journal of virology*, 85(11), pp.5423–35.
- Parish, I.A. & Kaech, S.M. (2009). Diversity in CD8(+) T cell differentiation. *Current opinion in immunology*, 21(3), pp.291–7.
- Pierre, P., Turley, S.J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R.M. et al. (1997). Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature*, 388(6644), pp.787–92.
- Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E., & Gallo, R.C. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science (New York, N.Y.)*, 224(4648), pp.497–500.
- Price, D.A., Klenerman, P., Booth, B.L., Phillips, R.E., & Sewell, A.K. (1999). Cytotoxic T lymphocytes, chemokines and antiviral immunity. *Immunology today*, 20(5), pp.212–6.
- Prussin, C. & Metcalfe, D.D. (2003). 4. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(2, Supplement 2), pp.S486–S494.
- Qin, A., Cai, W., Pan, T., Wu, K., Yang, Q., Wang, N., Liu, Y., Yan, D. et al. (2013). Expansion of monocytic myeloid-derived suppressor cells dampens T cell function in HIV-1-seropositive individuals. *Journal of virology*, 87(3), pp.1477–90.
- Randolph, G.J., Jakubzick, C., & Qu, C. (2008). Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Current opinion in immunology*, 20(1), pp.52–60.
- Raué, H.-P., Brien, J.D., Hammarlund, E., & Slifka, M.K. (2004). Activation of virus-specific CD8+ T cells by lipopolysaccharide-induced IL-12 and IL-18. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(11), pp.6873–81.
- Reich-Zeliger, S., Zhao, Y., Krauthgamer, R., Bachar-Lustig, E., & Reisner, Y. (2000). Anti-third party CD8+ CTLs as potent veto cells: coexpression of CD8 and FasL is a prerequisite. *Immunity*, 13(4), pp.507–15.
- Ricciotti, E. & FitzGerald, G.A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(5), pp.986–1000.
- Risser, R., Horowitz, J.M., & McCubrey, J. (1983). Endogenous mouse leukemia viruses. *Annual review of genetics*, 17, pp.85–121.
- Robertson, M.N., Spangrude, G.J., Hasenkrug, K., Perry, L., Nishio, J., Wehrly, K., & Chesebro, B. (1992). Role and specificity of T-cell subsets in spontaneous recovery from Friend virus-induced leukemia in mice. *Journal of virology*, 66(6), pp.3271–7.

- Rodenburg, M., Fischer, M., Engelmann, A., Harbers, S.O., Ziegler, M., Löhler, J., & Stocking, C.** (2007). Importance of receptor usage, Fli1 activation, and mouse strain for the stem cell specificity of 10A1 murine leukemia virus leukemogenicity. *Journal of virology*, 81(2), pp.732–42.
- Rössner, S., Voigtländer, C., Wiethe, C., Hänig, J., Seifarth, C., & Lutz, M.B.** (2005). Myeloid dendritic cell precursors generated from bone marrow suppress T cell responses via cell contact and nitric oxide production in vitro. *European journal of immunology*, 35(12), pp.3533–44.
- Rous, P.** (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *The Journal of experimental medicine*, 13(4), pp.397–411.
- Rous, P.** (1910). A transmissible avian neoplasm (sarcoma of the common fowl). *The Journal of experimental medicine*, 12(5), pp.696–705.
- Rudd, C.E. & Schneider, H.** (2003). Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nature reviews. Immunology*, 3(7), pp.544–56.
- Ryan, H.E., Poloni, M., McNulty, W., Elson, D., Gassmann, M., Arbeit, J.M., & Johnson, R.S.** (2000). Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer research*, 60(15), pp.4010–5.
- Sallusto, F. & Lanzavecchia, A.** (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine*, 179(4), pp.1109–18.
- Santiago, M.L., Smith, D.S., Barrett, B.S., Montano, M., Benitez, R.L., Pelanda, R., Hasenkrug, K.J., & Greene, W.C.** (2011). Persistent Friend virus replication and disease in Apobec3-deficient mice expressing functional B-cell-activating factor receptor. *Journal of virology*, 85(1), pp.189–99.
- Santoro, M.G., Benedetto, A., & Jaffe, B.M.** (1979). Prostaglandin A1 induces differentiation in Friend erythroleukemia cells. *Prostaglandins*, 17(5), pp.719–27.
- Satpathy, A.T., Wu, X., Albring, J.C., & Murphy, K.M.** (2012). Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nature immunology*, 13(12), pp.1145–54.
- Schmid, M.A., Kingston, D., Boddupalli, S., & Manz, M.G.** (2010). Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment. *Immunological reviews*, 234(1), pp.32–44.
- Schofield, C.J. & Ratcliffe, P.J.** (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(5), pp.343–54.
- Schwarz, B. a & Bhandoola, A.** (2006). Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis. *Immunological reviews*, 209, pp.47–57.
- Scott, P. & Trinchieri, G.** (1995). The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Current opinion in immunology*, 7(1), pp.34–40.

- Selliah, N., Jiyi, Y., & Finkel, T.H.** (2007). Silencing of HALP Decreases HIV-1 Infection of Primary CD4+ T-cells. *The Journal of Immunology*, 178(Supplement S57 (45.4)).
- Serbina, N. V, Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A., & Pamer, E.G.** (2003). TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*, 19(1), pp.59–70.
- Shedlock, D.J., Silvestri, G., & Weiner, D.B.** (2009). Monkeying around with HIV vaccines: using rhesus macaques to define “gatekeepers” for clinical trials. *Nature reviews. Immunology*, 9(10), pp.717–28.
- Shortman, K. & Liu, Y.J.** (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*, 2(3), pp.151–161.
- Sitkovsky, M. & Lukashev, D.** (2005). Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nature reviews. Immunology*, 5(9), pp.712–21.
- Slavuljica, I., Krmpotić, A., & Jonjić, S.** (2011). Manipulation of NKG2D ligands by cytomegaloviruses: impact on innate and adaptive immune response. *Frontiers in immunology*, 2(December), p.85.
- Standiford, T.J., Strieter, R.M., Chensue, S.W., Westwick, J., Kasahara, K., & Kunkel, S.L.** (1990). IL-4 inhibits the expression of IL-8 from stimulated human monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 145(5), pp.1435–9.
- Steinman, R.M. & Cohn, Z.A.** (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine*, 137(5), pp.1142–62.
- Steinman, R.M. & Hemmi, H.** (2006). Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Current topics in microbiology and immunology*, 311, pp.17–58.
- Stoye, J.P.** (1998). Fv1, the mouse retrovirus resistance gene. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 17(1), pp.269–77.
- Strestik, B.D., Olbrich, A.R., Hasenkrug, K.J., & Dittmer, U.** (2001). The role of IL-5, IL-6 and IL-10 in primary and vaccine-primed immune responses to infection with Friend retrovirus (Murine leukaemia virus). *The Journal of general virology*, 82(Pt 6), pp.1349–54.
- Sugamura, K., Ishii, N., & Weinberg, A.D.** (2004). Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nature reviews. Immunology*, 4(6), pp.420–31.
- Sun, J.C., Beilke, J.N., Bezman, N.A., & Lanier, L.L.** (2011). Homeostatic proliferation generates long-lived natural killer cells that respond against viral infection. *The Journal of experimental medicine*, 208(2), pp.357–68.
- Sun, J.C., Beilke, J.N., & Lanier, L.L.** (2009). Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*, 457(7229), pp.557–61.

- Sun, J.C. & Lanier, L.L.** (2011). NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8⁺ T cells. *Nature reviews. Immunology*, 11(10), pp.645–57.
- Takahata, S., Sogawa, K., Kobayashi, A., Ema, M., Mimura, J., Ozaki, N., & Fujii-Kuriyama, Y.** (1998). Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1a, HLF, and clock. *Biochemical and biophysical research communications*, 248(3), pp.789–94.
- Tan, J.K.H. & O'Neill, H.C.** (2005). Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *Journal of leukocyte biology*, 78(2), pp.319–24.
- Timonen, T., Ortaldo, J.R., & Herberman, R.B.** (1981). Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *The Journal of experimental medicine*, 153(3), pp.569–82.
- Tinoco, R., Alcalde, V., Yang, Y., Sauer, K., & Zuniga, E.I.** (2009). Cell-intrinsic transforming growth factor-beta signaling mediates virus-specific CD8⁺ T cell deletion and viral persistence in vivo. *Immunity*, 31(1), pp.145–57.
- Toniolo, A., Matteucci, D., Pistillo, M.P., Gori, Z., & Bendinelli, M.** (1980). Early replication of Friend leukaemia viruses in spleen macrophages. *The Journal of general virology*, 49(1), pp.203–8.
- Travaglion, S., Falzano, L., Fabbri, a, Stringaro, a, Fais, S., & Fiorentini, C.** (2002). Epithelial cells and expression of the phagocytic marker CD68: scavenging of apoptotic bodies following Rho activation. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 16(4), pp.405–11.
- UNAIDS** (2011). AIDSinfo.
- De Veer, M.J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J.M., Silverman, R.H., & Williams, B.R.** (2001). Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *Journal of leukocyte biology*, 69(6), pp.912–20.
- Vollbrecht, T., Stirner, R., Tufman, A., Roider, J., Huber, R.M., Bogner, J.R., Lechner, A., Bourquin, C. et al.** (2012). Chronic progressive HIV-1 infection is associated with elevated levels of myeloid-derived suppressor cells. *AIDS (London, England)*, 26(12), pp.F31–7.
- Wagner, L., Yang, O.O., Garcia-Zepeda, E.A., Ge, Y., Kalams, S.A., Walker, B.D., Pasternack, M.S., & Luster, A.D.** (1998). Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature*, 391(6670), pp.908–11.
- Wagner, M., Gutermann, A., Podlech, J., Reddehase, M.J., & Koszinowski, U.H.** (2002). Major histocompatibility complex class I allele-specific cooperative and competitive interactions between immune evasion proteins of cytomegalovirus. *The Journal of experimental medicine*, 196(6), pp.805–16.

- Wakisaka, N., Kondo, S., Yoshizaki, T., Muro, S., Furukawa, M., & Pagano, J.S.** (2004). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces synthesis of hypoxia-inducible factor 1 α . *Molecular and cellular biology*, 24(12), pp.5223–34.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E. a, & Semenza, G.L.** (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), pp.5510–4.
- Weissman, I.L.** (2002). The road ended up at stem cells. *Immunological reviews*, 185, pp.159–74.
- Wenger, R.H.** (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(10), pp.1151–62.
- Wenger, R.H., Stiehl, D.P., & Camenisch, G.** (2005). Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2005(306), p.re12.
- Wilson, E.B. & Brooks, D.G.** (2011). The role of IL-10 in regulating immunity to persistent viral infections. *Current topics in microbiology and immunology*, 350, pp.39–65.
- Wirth, J.J., Kierszenbaum, F., & Zlotnik, A.** (1989). Effects of IL-4 on macrophage functions: increased uptake and killing of a protozoan parasite (*Trypanosoma cruzi*). *Immunology*, 66(2), pp.296–301.
- Wobben, R., Hüsecken, Y., Lodewick, C., Gibbert, K., Fandrey, J., & Winning, S.** (2013). Role of hypoxia inducible factor-1 α for interferon synthesis in mouse dendritic cells. *Biological chemistry*, 394(4), pp.495–505.
- Yamaguchi, S., Hasegawa, M., Suzuki, T., Ikeda, H., Aizawa, S., Hirokawa, K., & Kitagawa, M.** (2003). In vivo distribution of receptor for ecotropic murine leukemia virus and binding of envelope protein of Friend Murine leukemia virus. *Archives of virology*, 148(6), pp.1175–84.
- Youn, J.-I., Collazo, M., Shalova, I.N., Biswas, S.K., & Gabrilovich, D.I.** (2012). Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of leukocyte biology*, 91(1), pp.167–81.
- Youn, J.-I., Nagaraj, S., Collazo, M., & Gabrilovich, D.I.** (2008). Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(8), pp.5791–802.
- Young, M.R., Newby, M., & Wepsic, H.T.** (1987). Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer research*, 47(1), pp.100–5.
- Zelinskyy, G., Dietze, K.K., Hüsecken, Y.P., Schimmer, S., Nair, S., Werner, T., Gibbert, K., Kershaw, O. et al.** (2009). The regulatory T-cell response during acute retroviral infection is locally defined and controls the magnitude and duration of the virus-specific cytotoxic T-cell response. *Blood*, 114(15), pp.3199–3207.

- Zelinskyy, G., Kraft, A.R.M., Schimmer, S., Arndt, T., & Dittmer, U.** (2006). Kinetics of CD8⁺ effector T cell responses and induced CD4⁺ regulatory T cell responses during Friend retrovirus infection. *European journal of immunology*, 36(10), pp.2658–70.
- Zelinskyy, G., Robertson, S.J., Schimmer, S., Messer, R.J., Hasenkrug, K.J., & Dittmer, U.** (2005). CD8⁺ T-cell dysfunction due to cytolytic granule deficiency in persistent Friend retrovirus infection. *Journal of virology*, 79(16), pp.10619–26.
- Zhang, J., Diehl, G.E., & Littman, D.R.** (2008). Relief of preintegration inhibition and characterization of additional blocks for HIV replication in primary mouse T cells. *PloS one*, 3(4), p.e2035.
- Zhang, N. & Bevan, M.J.** (2011). CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*, 35(2), pp.161–8.
- Zhang, N. & Bevan, M.J.** (2010). Dicer controls CD8⁺ T-cell activation, migration, and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50), pp.21629–34.
- Zhang, X., Jin, J., Tang, Y., Speer, D., Sujkowska, D., & Markovic-Plese, S.** (2009). IFN-beta1a inhibits the secretion of Th17-polarizing cytokines in human dendritic cells via TLR7 up-regulation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(6), pp.3928–36.
- Zhou, J., Fandrey, J., Schümann, J., Tiegs, G., & Brüne, B.** (2003). NO and TNF-alpha released from activated macrophages stabilize HIF-1alpha in resting tubular LLC-PK1 cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 284(2), pp.C439–46.
- Zinkernagel, A.S., Johnson, R.S., & Nizet, V.** (2007). Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 85(12), pp.1339–46.
- Zinkernagel, R.M. & Doherty, P.C.** (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 248(450), pp.701–2.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro
A2BAR	A2b Adenosin Rezeptor
Abb.	Abbildung
ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat-Puffer
ADM	Adrenomedullin
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AF	Alexa Fluor
AIDS	erworbenes Immunschwäche-Syndrom (<i>acquired immunodeficiency syndrom</i>)
AK	Antikörper
AP-1	Aktivatorprotein 1
APC	Antigen präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
APC	Allophycocyanin
APC/Cy7	Allophycocyanin-Cy7
APS	Ammoniumpersulfat
ARG1	Arginase 1
ARNT	Arylhydrocarbon Rezeptor Nuklear Translokator
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	B-Zellrezeptor (<i>B cell receptor</i>)
bHLH	basisches Helix-Loop-Helix
BmDC	aus dem Knochenmark generierte Dendritische Zellen (<i>bone marrow-derived dendritic cells</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Celsius
C	konstant (<i>constant</i>)
CA	Kapsid
ca.	Circa
CAD	C-terminale Transaktivierungsdomäne
CBP	CREB-bindendes Protein
CD	Nomenklatur für Zelloberflächenmoleküle (<i>Cluster of differentiation</i>)
cDC	klassische dendritische Zellen

cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDP	gemeinsamen dendritische Vorläuferzelle (<i>common dendritic progenitor</i>)
CLP	gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle (<i>common lymphoid progenitor</i>)
COX2	Cyclooxygenase 2
CPAF	<i>chlamydial protease-like activity factor</i>
C _t	<i>Cycle Threshold</i>
CTL	zytotoxische T-Zelle (<i>cytotoxic T cell</i>)
cyc	Zyklen (<i>cycles</i>)
d.h.	das heißt
DAB	Diaminobenzidin
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DF	Double-floxed
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMR1	<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i>
env	<i>envelope</i>
EPC	Erythrozytenvorläuferzelle (<i>erythrocyte progenitor cell</i>)
EPO	Erythropoietin
EPO-R	Erythropoietin Rezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	Fötales Kälberserum
FCS	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
FeLV	felines Leukämievirus
FIH	<i>Factor-inhibiting HIF</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
F-MuLV	murines Friend Leukämievirus
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
FV	Friend Virus
FVD	<i>fixable viability dye</i>
fwd	vorwärts (<i>forward</i>)

g	Gravitation, Erdbeschleunigung
g	Gramm
gag	<i>group associated antigen</i>
Glut-1	Glukose-Transporter-1
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktor (<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
GTC	Guanidiniumisothiocyanat
GzmB	Granzym B
H	schwer (<i>heavy</i>)
h	Stunde(n)
H&E	Hämatoxylin und Eosin
H-2	muriner MHC-Komplex
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor (<i>hypoxia-inducible factor</i>)
HIF-1 $\alpha^{f+/f+}$	homozygote Mäuse mit einem beidseitig von loxP-sites flankiertem Exon 2 des HIF-1 α Gen
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HLDA	<i>human leucocyte differentiation antigen</i>
HRE	Hypoxie-responsives Element
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
HSV	Herpes Simplex Virus
HTLV	humanes T-Zell-Leukämie Virus
i.v.	intravenös
ICOS	Induzierbares kostimulatorisches Molekül (<i>inducible costimulatory molecule</i>)
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
IN	Integrase
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
iPAS	inhibitorisches PAS
JAK-ISGF3	Janus Kinase 1 – IFN- γ -stimulierter Genfaktor-3
l	Liter
L	leicht (<i>light</i>)

LCMV	lymphozytärer Choriomeningitisvirus
LDV	Laktat Dehydrogenase
LMP1	latente Membranprotein 1
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	<i>long terminal repeats</i>
M	Molar
MA	Matrix
Mac-1	<i>macrophage antigen 1</i>
MACS	Magnetische Zellsortierung (<i>magnetic activated cell sorting</i>)
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
mCAT1	muriner Aminosäure Transporter 1
MCMV	murines Cytomegalievirus
MDP	Makrophagen-Dendritischer Zellvorläufer (<i>macrophage-dendritic cell progenitor</i>)
MDSC	myeloische Suppressorzellen (<i>myeloid derived suppressor cells</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute(n)
MMTV	Maus-Mammatumovirus
mRNA	messenger RNA
mu	Murin
MuLV	murines Leukämievirus
Mxi1	<i>max interacting protein 1</i>
n	Nano
NAD	N-terminale Transaktivierungsdomäne
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NKG2D	<i>natural killer group 2D</i>
NKT	Natürliche Killer T-Zellen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO ⁻	Stickstoffmonoxid
NTP	Nukleotid Triphosphate
ODDD	Sauerstoff-abhängige Abbaudomäne (<i>oxygen-dependent degradation domain</i>)
ORF	offenes Leseraster
OVA	Ovalbumin
pA	Polyadenylierungsstelle
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)

PAS	Per-ARNT-Sim
PB	Pacific Blue
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pDC	plasmazytoide dendritische Zellen
PE	R-Phycoerythrin
PE/Cy7	Phycoerythrin-Cy7
Per	Period
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein Komplex
PFA	Paraformaldehyd
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PGK	Phosphoglyceratkinase
pH	-log [H ⁺]
PHD	Prolylhydroxylasen
PI	Propidiumiodid
Pit	Anorganischer Phosphat Transporter (<i>inorganic phosphate transporter</i>)
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	Mustererkennungs-Rezeptoren (<i>pattern-recognition receptor</i>)
PTT	Polypurin-Abschnitt
pVHL	Von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein
RAE-1	<i>mRNA export factor 1</i>
Rev	zurück (<i>reverse</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RSV	Respiratorische-Synzytial-Virus
RSV	Rous-Sarkom Virus
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde(n)
s.	Siehe
S.	Seite

SCR-1	Steroid Rezeptor Coaktivator-1
SD	Spleiß Donor
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SFFU	<i>Spleen Focus Forming Units</i>
sf-Stk	<i>short form of stem-cell-kinase</i>
SFV	<i>Simian foamy virus</i>
Sim	single-minded
SIV	Affen Immundefizienzvirus (<i>simian immunodeficiency virus</i>)
SPF	speziell pathogenfrei
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>sideward scatter</i>)
ssRNA	einzelsträngige RNA
SU	Oberflächenprotein (<i>surface unit</i>)
Tab.	Tabelle
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung (<i>TRIS buffered saline</i>)
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
T _{FH}	follikuläre T-Helferzelle
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
T _H	T-Helferzelle
TIF-2	<i>Transcription intermediary factor-2</i>
Tip-DC	TNF/iNOS produzierende Dendritische Zellen
TLR	Toll-like Rezeptor
TM	Transmembranproteine
TNF	Tumornekrosefaktor
Tpi	Tage <i>post infectionem</i>
Tris-Base	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	variable
VDJ	<i>variable, diverse, joining</i>
VE	vollentsalzt
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
vgl.	Vergleiche

Vol.	Volumen
vRNA	virale RNA
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
WDSV	<i>Walleye dermal sarcoma virus</i>
Wpi	Wochen <i>post infectionem</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Ψ	Verpackungssignal

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Das angeborene und adaptive Immunsystem (verändert nach Dranoff 2004)	11
Abb. 1.2: Domänenstruktur von HIF-1 α und HIF-1 β /ARNT (Schofield & Ratcliffe 2004)	18
Abb. 1.3: Regulation der HIF-1 α Untereinheit durch Prolyl- und Asparaginhydroxylierung (Schofield & Ratcliffe 2004)	19
Abb. 1.4: Einfluss inflammatorischer Stimuli auf die Regulation von HIF-1 α	21
Abb. 1.5: Aufbau eines Typ-C Retrovirus bei Säugetieren am Beispiel von F-MuLV (verändert nach Maetzig et al. 2011)	24
Abb. 1.6: Provirale Genomstruktur von MuLV (Maetzig et al. 2011)	25
Abb. 1.7: Replikationszyklus von MuLV (Maetzig et al. 2011)	28
Abb. 3.1: Verschiedene Möglichkeiten der magnetischen Zellsortierung (Miltenyi Biotec 2013)	44
Abb. 3.2: Schematischer Aufbau des T-Zellproliferations- und Aktivierungsassays	46
Abb. 3.3: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers (Life Technologies Corporation 2013)	49
Abb. 4.1: Signifikante Knock-out-Effizienz in BmDCs aus CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen..	62
Abb. 4.2: Chronische FV Infektion resultiert in erhöhter Splenomegalie bei einem Teil der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäuse	63
Abb. 4.3: Stark vergrößerte Milz bei HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Tieren nach chronischer Virusinfektion	64
Abb. 4.4: Signifikant erhöhte Anzahl von Ter119 ⁺ Erythrozyten in den Milzen einiger der chronisch infizierten HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäuse	65
Abb. 4.5: Höchste Viruslast 5 Tpi mit erneutem Anstieg in einigen chronisch infizierten HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen	66
Abb. 4.6: Rezidivierende Induktion der FV Virus mRNA in den dendritischen Zellen chronisch infizierter HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäuse	67
Abb. 4.7: Fortschreitender Verlust der Milzstruktur in FV-infizierten HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen....	69
Abb. 4.8: Keine Veränderung der Milzstruktur in FV-infizierten CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäuse	69
Abb. 4.9: Fortschreitender Verlust der Lymphfollikel der Milz bei infizierten HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen	70
Abb. 4.10: Erhöhte Anzahl an antigenpräsentierenden Zellen in der Milz von HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäuse nach chronischer FV Infektion	72
Abb. 4.11: Erhöhte Aktivierung von dendritischen Zellen und Makrophagen während der akuten FV Infektion	74

Abb. 4.12: Chronische FV Infektion resultiert in erhöhter Granulozytenzahl in HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen 12 Wpi ^{hoch}	75
Abb. 4.13: Verringerte adaptive Immunantwort in HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen mit hoher Viruslast nach chronischer FV Infektion	77
Abb. 4.14: Chronische FV Infektion resultiert in einem erhöhten Anteil von regulatorischen T-Zellen in der CD4 ⁺ Population in HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen mit hoher Viruslast	78
Abb. 4.15: Signifikanter Anstieg myeloischer Suppressorzellen in der Milz nach chronischer FV Infektion in HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen	79
Abb. 4.16: Zunehmende Aktivierung von CD8a ⁺ zytotoxischen T-Zellen bei akuter FV Infektion	80
Abb. 4.17: Höchster Anteil Granzym B positiver T-Zellen 11 Tpi in CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen	81
Abb. 4.18: Kokultivierung mit BmDCs führt zu keiner Einschränkung in der Vitalität der T-Zellen	83
Abb. 4.19: Erhöhte CD43 Aktivierung von CD8a ⁺ zytotoxischen T-Zellen bei akuter FV Infektion	84
Abb. 4.20: Maximum an degranulierenden und Granzym B positiven Zellen während akuter FV Infektion	85
Abb. 4.21: Induktion der HIF-1 α mRNA in den dendritischen Zellen 5 Tage <i>post infectionem</i> unter Hypoxie	87
Abb. 4.22: Verstärkte HIF-1 α Proteinakkumulation 11 Tage <i>post infectionem</i> unter Hypoxie in dendritischen Zellen aus HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen	88
Abb. 4.23: Verstärkte HIF-1 α Proteinakkumulation 11 Tage <i>post infectionem</i> unter Hypoxie in dendritischen Zellen aus CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen	88
Abb. 4.24: Erhöhte Induktion der ADM mRNA Expression in der frühen Phase der akuten FV Infektion	89
Abb. 4.25: Reduzierte Glut-1 mRNA Expression unter Hypoxie nach FV Infektion von CD11cCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäusen	90
Abb. 4.26: Reduzierte MHC I mRNA Expression nach Maximum an Tag 5 nach Infektion .	91
Abb. 4.27: Reduzierte MHC II mRNA Expression nach Maximum 5 Tpi	92
Abb. 4.28: Deutlicher Anstieg der TLR7 mRNA Expression unter Hypoxie 5 Tpi	93
Abb. 4.29: Chronische FV Infektion resultiert in erhöhter Splenomegalie bei einem Teil der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ und CD4Cre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ Mäuse	95

Abb. 4.30: Chronische FV Infektion führt zu einer erhöhten Viruslast bei der Hälfte der HIF-1 α ^{+f/+f} und CD4Cre/HIF-1 α ^{+f/+f} Mäusen	95
Abb. 4.31: Erhöhte Anzahl der myeloischen Suppressorzellen in chronischer infizierten Mäusen mit hoher Viruslast.....	96

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Taxonomie der Retroviren (ICTV 2013)	25
Tabelle 2.1: Verwendete Geräte	32
Tabelle 2.2: Verwendete Materialien	33
Tabelle 2.3: Puffer und Medien	35
Tabelle 2.4: Antikörper für Western Blot	36
Tabelle 2.5: Fluorochrom-Charakterisierung	36
Tabelle 2.6: Antikörper für die Durchflusszytometrie	37
Tabelle 2.7: Reagenzien und Enzyme für cDNA-Synthese, PCR und Echtzeit-PCR.....	39
Tabelle 2.8: Primersequenz, Annealing-Temperaturen und Zyklenanzahl.....	39
Tabelle 2.9: Primersequenz, Annealing-Temperaturen und Zyklenanzahl für Genotypisierung	40
Tabelle 3.1: Mastermix für Genotypisierung	41
Tabelle 3.2: Eingesetzte Oberflächenantikörper, deren Zielzellen und Verdünnung	50
Tabelle 3.3: Eingesetzte intrazelluläre Antikörper, deren Zielzellen und Verdünnung.....	52
Tabelle 3.4: Antikörper für Western Blot	55
Tabelle 3.5: Mastermix für cDNA Synthese	57
Tabelle 3.6: Mastermix für PCR	58
Tabelle 3.7: Mastermix für Echtzeit-PCR.....	59

8.4 Publikationsliste

Publikationen

- 1) **Wobben, R., Hüsecken, Y., Lodewick, C., Gibbert, K., Fandrey, J., & Winning, S.** (2013). Role of hypoxia inducible factor-1 α for interferon synthesis in mouse dendritic cells. *Biological chemistry*, 394(4), pp.495–505.
- 2) **Zelinskyy, G., Dietze, K.K., Hüsecken, Y.P., Schimmer, S., Nair, S., Werner, T., Gibbert, K., Kershaw, O. et al.** (2009). The regulatory T-cell response during acute retroviral infection is locally defined and controls the magnitude and duration of the virus-specific cytotoxic T-cell response. *Blood*, 114(15), pp.3199–3207.

Poster

- 1) **Hüsecken, Y., Fandrey, J., & Winning, S.** (2011). *Charakterisierung myeloischer Zellen unter entzündlicher Hypoxie*. Forschungstag der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Essen.
- 2) **Hüsecken, Y., Fandrey, J., & Winning, S.** (2012). *Characterization of dendritic cells under inflammatory hypoxia*. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Dresden.
- 3) **Hüsecken, Y., Fandrey, J., & Winning, S.** (2012). *Characterization of dendritic cells under inflammatory hypoxia*. 9th International Luebeck EPO Conference, Lübeck.
- 4) **Hüsecken, Y., Lodewick, C., Schimmer, S., Dittmer, U., Fandrey, J. & Winning, S.** (2012). *Influence of hypoxia inducible factor (HIF)-1 deficiency in dendritic cells on the course of acute and chronic viral infections*. 3rd Meeting of the Transregional Collaborative Research Center (TRR60), Shanghai.
- 5) **Hüsecken, Y., Lodewick, C., Schimmer, S., Dittmer, U., Fandrey, J. & Winning, S.** (2012). *Influence of hypoxia inducible factor (HIF)-1 deficiency in dendritic cells on the course of acute and chronic viral infections*. Forschungstag der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Essen.
- 6) **Hüsecken, Y., Lodewick, C., Schimmer, S., Dittmer, U., Fandrey, J. & Winning, S.** (2013). *Influence of hypoxia inducible factor (HIF)-1 deficiency in dendritic cells on the course of acute and chronic viral infections*. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Heidelberg.
- 7) **Hüsecken, Y., Lodewick, C., Neugebauer, A., Schimmer, S., Dittmer, U., Fandrey, J. & Winning, S.** (2013). *Influence of dendritic cell specific hypoxia inducible factor (HIF)-1 α knockout on the course of acute and chronic viral infections*. Forschungstag der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Essen.

8.5 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

8.6 Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Fandrey für die motivierende, freundliche und geduldige Betreuung sowie sein wissenschaftliches Interesse und seine Unterstützung bei der Durchführung und Korrektur dieser Arbeit.

Besonders danke ich auch Dr. Sandra Winning, welche mich während der ganzen Zeit mit Rat und Tat unterstützt hat. Ohne deine Geduld und die vielen hilfreichen Erklärungen und Vorschläge wäre es sehr viel schwerer gewesen die Arbeit zusammenzutragen. Vor allem in den letzten Wochen warst du mir eine große Hilfe und hast mich immer unterstützt.

Mein weiterer Dank gilt Katharina Flück, Anika Thiel, Michael Schwartz, Claudia Lodewick, Veronika Reichmann, Agnes Neugebauer, Dr. Teresa Otto, Dr. Timm Schreiber und allen anderen in unserer wirklich großen Arbeitsgruppe. Ohne euch wäre das Leben sehr viel langweiliger gewesen, ihr wart mir immer eine große Stütze und habt mich so manches Mal vor dem Verzweifeln bewahrt. Danke für das tolle Arbeitsklima, die (nicht immer) wissenschaftlichen Gespräche und eure Unterstützung.

Zudem bedanke ich bei Prof. Dr. Ulf Dittmer, Simone Schimmer und Dr. Kathrin Gibbert vom Institut für Virologie der Universität Duisburg-Essen, welche mich mit ihrem Wissen bei der Durchführung der FV Versuche unterstützt haben.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden bedanken. Ihr hattet immer ein offenes Ohr, Geduld und Verständnis für mich und habt mich in jeder Situation unterstützt. Danke, dass ihr immer für mich da seid.

9 Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie und Geografie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Die Bedeutung des Hypoxie-induzierbaren Faktor-1 in dendritischen Zellen für den Verlauf von akuten und chronischen Virusinfektionen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Yvonne Petra Hüsecken befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den 11.12.2013

Prof. Dr. J. Fandrey

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie und Geografie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 11.12.2013

Yvonne Petra Hüsecken

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie und Geografie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den 11.12.2013

Yvonne Petra Hüsecken